



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE  
ANTIOXIDANTES NATURALES Y MINERALES**

---

**M. Sc. ALEX FERNANDO LÓPEZ CÓRDOBA**

Directoras: Dra. MIRIAM N. MARTINO (*In memoriam*)

Dra. ALBA S. NAVARRO

La Plata, Diciembre de 2014.

El presente trabajo de Tesis para optar al título de **Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas área Química** fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), bajo la dirección de la Dra. Miriam N. Martino (*In memoriam*) y la Dra. Alba S. Navarro.

## **DEDICATORIA**

*A Cami y a Caro,*

porque son una gran razón para vivir y un motivo para ser feliz...Las amo!

*A la Dra. Miriam Martino (In memoriam)*

por ser un modelo a seguir, fue un honor trabajar con Ud.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar gracias a todos los que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo de tesis:

A mi Dios, por ser el todo en todo. Por creer en mis sueños desde el principio.

A la Dra. Miriam Martino, que aunque ya no esté aquí, su presencia y compañía siempre es enorme. Por los detalles, los momentos compartidos y las enseñanzas.

A la Dra. Alba Navarro por el compromiso, la paciencia, las charlas, los consejos, la diligencia y las libertades.

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el financiamiento otorgado.

Al CIDCA por facilitarme el equipamiento y las instalaciones para el desarrollo de las actividades. A los investigadores, becarios y técnicos por cada una de sus contribuciones.

Al Prof. Arturo Hoya y a la Lic. Soledad Matera por sus importantes contribuciones al desarrollo de los comprimidos.

A la Dra. Lorena Deladino por los detalles, el acompañamiento y los trabajos científicos compartidos.

A las Dras. Verónica Bucalá y Loreana Gallo (PLAPIQUI-CONICET) por permitirme realizar ensayos en su laboratorio.

A la Lic. Leidy Agudelo por los análisis cromatográficos de las muestras.

A la Ing. Jeanine Peñaloza por facilitarme el uso del analizador de sorción de vapor.

A los Dres. Javier Amalvy y Sebastián Anbinder por los análisis de espectroscopía de infrarrojo.

A mi Familia y Amigos, en especial a Mamá, por ser siempre cómplices de todas mis locuras.

A Caro por ser mi compañera de vida y a Cami por ser el motor de nuestro amor.

## RESUMEN

Las nuevas tendencias en el sector de alimentos incluyen la obtención de productos que, además de ser fuente de macronutrientes, aporten compuestos bioactivos que prevengan la aparición de enfermedades crónicas; siendo cada vez más importante satisfacer las necesidades específicas de poblaciones de individuos, ya sea en estado saludable o con una enfermedad particular. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar sistemas de vehiculización para el transporte individual o simultáneo de antioxidantes naturales y minerales.

Se obtuvieron polvos conteniendo zinc, extracto de yerba mate o una combinación de ambos, mediante la técnica de co-cristalización en matrices de sacarosa. En general, los productos obtenidos mostraron buena fluidez y bajos valores de contenido de humedad, actividad acuosa e higroscopicidad. Además, los compuestos activos encapsulados mostraron una buena estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento. Se prepararon bebidas con antioxidantes naturales usando como ingrediente los polvos con extracto de yerba mate. Estas fueron evaluadas sensorialmente por un panel de jueces no entrenados, encontrando elevados niveles de aceptación.

Por otro lado, se prepararon tabletas mediante compresión directa, mezclando los compuestos activos encapsulados (zinc, extracto de yerba mate o una combinación de ambos) con excipientes (almidón de maíz y estearato de magnesio). Todas las formulaciones mostraron óptimas características de manipuleo (fluidez y humedad) y buena compactibilidad. Se evaluaron los atributos sensoriales de las tabletas obteniendo una buena aceptabilidad.

Finalmente, se desarrollaron tabletas compartimentalizadas para co-vehiculización de zinc y extracto de yerba mate. Estas matrices permitieron mantener las propiedades individuales de cada compuesto activo. Para la compartimentalización, el almidón de maíz nativo fue usado como un vehículo de zinc. Las tabletas obtenidas se desintegraron rápidamente y mostraron una alta velocidad de liberación de los compuestos activos en agua.

Los sistemas desarrollados para la vehiculización de minerales y antioxidantes naturales constituyen una alternativa para aumentar la ingesta dietaria de estos compuestos bioactivos con propiedades saludables.

**Palabras claves:** Antioxidantes; Co-cristalización; Polvos; Tabletillas comprimidas; Yerba mate; Zinc.

## ABSTRACT

New trends in the food field include the development of products that, beyond to providing macronutrients, promote the intake of bioactive compounds to prevent chronic diseases; becoming more important to address the specific requirements of individual populations, either in healthy state or with particular diseases. The objective of the present work was to develop carrier systems for individual or simultaneous delivery of natural antioxidants and minerals.

Powders with zinc, yerba mate extract or a combination of both were obtained by co-crystallization with sucrose matrices. In general, the obtained products showed good flowability and low values of moisture content, water activity and hygroscopicity. Moreover, the encapsulated active compounds exhibited good physicochemical stability during storage. Antioxidant-rich beverages were prepared using the powders with yerba mate extract as an ingredient. The sensory evaluation of the beverages was performed by a panel of untrained judges and they found a high level of acceptability.

In addition, tablets obtained by direct compression were prepared blending the active compounds (zinc, yerba mate extract or a combination of both) with excipients (corn starch and magnesium stearate). All formulations showed optimal handling characteristics (flowability and moisture content) and good compactibility. The sensory evaluation of the tablets was also performed obtaining optimal acceptability.

Finally, compartmentalized tablets for simultaneous carrying of zinc and yerba mate extract were developed. These matrices allow to maintaining the individuals properties of each active compound. For the compartmentalization, native corn starch was used as zinc vehicle. The obtained tablets were disintegrated rapidly and they showed a high release rate of active compounds to the aqueous medium.

The developed systems for the delivery of natural antioxidants and minerals constitute an alternative to increase the dietary intake of these bioactive compounds with healthy properties.

**Keywords:** Antioxidants; Co-crystallization; Powders; Compressed tablets; Yerba mate; Zinc.

## TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS DOCTORAL

Los siguientes trabajos fueron publicados en revistas con referato internacional:

1. **López Córdoba, A. F.**, Deladino L., Agudelo Meza, L. & Martino M.N. Yerba mate antioxidants powders obtained by co-crystallization technique: stability during storage. *Journal of Food Engineering*. 124, 158-165. 2014.
2. **López Córdoba, A. F.**, Deladino L & Martino M.N. Corn starch-calcium alginate matrices for the simultaneous carrying of zinc and yerba mate antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*. 59(2, Part 1), 641-648. 2014.
3. **López Córdoba A.F.**, Matera S, Deladino L, Hoya A, Navarro A. & Martino M. Compressed tablets based on mineral-functionalized starch and co-crystallized natural antioxidants. *Journal of Food Engineering*. 146, 234-242. 2015.

Además parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en las actas de los siguientes congresos nacionales e internacionales:

1. Co-cristalización de extractos antioxidantes de yerba mate en matrices de sacarosa. **Alex López Córdoba**, Lorena Deladino y Miriam Martino. Memorias XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). Rosario, Argentina. 2013.
2. Matrices poliméricas compuestas para la encapsulación de extracto de yerba mate y zinc. **Alex López Córdoba**, Lorena Deladino y Miriam Martino. Memorias X Simposio Argentino de Polímeros. Buenos Aires, Argentina. 2013.
3. Desarrollo de sistemas de encapsulación para la vehiculización simultánea de extractos de yerba mate y zinc. **Alex López Córdoba**, Lorena Deladino, Alba Navarro y Miriam Martino. Memorias VI Congreso Sudamericano de Yerba Mate y II Simposio Internacional de Yerba Mate y Salud. Montevideo, Uruguay. 2014.
4. Solid dosage forms (powders and tablets) as an alternative to prevent zinc nutritional deficiency. **Alex López Córdoba**, Alba Navarro y Miriam Martino. International Conference on Food Innovation (Food Innova). Concordia, Argentina. 2014.
5. Vehiculización de extractos antioxidantes de yerba mate en matrices de glucosa-sacarosa. **Alex López Córdoba**, Jeanine Peñaloza, Alba Navarro y Miriam Martino. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC). Córdoba, Argentina. 2014.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1. ESTADO DEL ARTE .....	1
1. Compuestos antioxidantes y su importancia para la salud .....	1
1.1. Antioxidantes endógenos.....	3
1.2. Antioxidantes dietarios .....	4
2. Aplicaciones de los compuestos antioxidantes en la industria de alimentos.....	7
3. Encapsulación de compuestos bioactivos.....	9
3.1. Técnicas de encapsulación.....	11
3.2. Co-cristalización en matrices de sacarosa .....	14
OBJETIVOS .....	18
Capítulo 2. SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE .....	19
Introducción.....	19
Parte I. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	22
Materiales y métodos.....	22
1. Preparación de los extractos de yerba mate .....	22
2. Contenido de materia seca .....	22
3. Contenido de polifenoles totales.....	22
4. Evaluación de la actividad antioxidante .....	23
4.1. Capacidad inhibitoria frente al radical DPPH .....	23
4.2. Capacidad reductora de iones férricos (FRAP) .....	24
5. Determinación de los principales compuestos activos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	24
6. Identificación de los principales grupos funcionales mediante FTIR .....	25
7. Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).....	25
8. Patrón de difracción de rayos X .....	25
9. Isotermas de adsorción .....	26
10. Modelado matemático de las isotermas de adsorción .....	26
11. Análisis estadístico .....	27
Resultados y discusión .....	27
1. Contenido de materia seca, concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante .....	27

2. Perfil cuali-cuantitativo del extracto de yerba mate obtenido por HPLC.....	29
3. Identificación de los principales grupos funcionales presentes en el extracto de yerba mate mediante FTIR .....	31
4. Patrón de difracción de rayos X y temperatura de transición vítrea del extracto seco de yerba mate.....	32
5. Isotermas de adsorción del extracto seco de yerba mate .....	33
<b>PARTE II. POLVOS ANTIOXIDANTES OBTENIDOS POR CO-CRISTALIZACIÓN DE EXTRACTO DE YERBA MATE EN MATRICES DE SACAROSA Y GLUCOSA-SACAROSA.....</b>	<b>36</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>36</b>
1. Preparación de los polvos con extracto de yerba mate mediante co-cristalización.....	36
2. Efecto del proceso de co-cristalización sobre los agentes encapsulantes.....	38
3. Efecto del proceso de co-cristalización sobre los compuestos activos.....	39
3.1. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación .....	39
3.2. Actividad antioxidante de los extractos de yerba mate encapsulados .....	40
4. Contenido de humedad y actividad acuosa .....	40
5. Calorimetría diferencial de barrido.....	40
6. Microscopía electrónica de barrido .....	40
7. Análisis de color .....	41
8. Tiempo de disolución en agua .....	41
9. Propiedades de flujo .....	41
9.1. Angulo de reposo dinámico.....	41
9.2. Índices de Hausner y Carr .....	42
10. Identificación de principales grupos funcionales mediante FTIR .....	43
11. Isotermas de adsorción .....	43
12. Estabilidad del extracto de yerba mate encapsulado durante el almacenamiento .....	43
12.1. Cinética de ganancia de agua e higroscopicidad .....	43
12.2. Estabilidad química del extracto de yerba mate encapsulado .....	44
12.3. Cristalinidad y análisis morfológico.....	44
13. Aplicación de los polvos con antioxidantes de yerba mate en la formulación de una bebida refrescante .....	44
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>47</b>
1. Optimización de las variables del proceso de co-cristalización .....	47

2. Eficiencia de encapsulación, contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante .....	50
3. Estabilidad térmica de los productos encapsulados.....	51
4. Análisis morfológico y atributos de color .....	53
5. Cinética de disolución en agua de los polvos con extracto de yerba mate .....	55
6. Propiedades de flujo .....	56
7. Análisis de interacciones mediante FT-IR.....	58
8. Isotermas de adsorción .....	59
9. Estabilidad de los extractos de yerba mate encapsulados durante almacenamiento ...	61
9.1. Ganancia de agua e higroscopicidad .....	61
9.2. Contenido de compuestos activos y actividad antioxidante .....	62
9.3. Patrones de difracción de rayos X y análisis morfológico de los polvos con extracto de yerba mate almacenados .....	67
10. Aplicación de los extractos de yerba mate co-cristalizados con sacarosa en la preparación de bebidas refrescantes .....	69
Conclusiones parciales .....	72
Capítulo 3. SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE ZINC .....	73
Introducción.....	73
Materiales y métodos.....	79
1. Preparación de los polvos con zinc mediante co-cristalización en matrices de sacarosa .....	79
2. Determinación del contenido de compuesto activo.....	79
3. Caracterización de los polvos con zinc .....	80
4. Ensayo de compactibilidad de los polvos con zinc .....	80
5. Formulación de los comprimidos .....	81
6. Preparación de los comprimidos.....	81
7. Caracterización de los comprimidos .....	82
7.1. Uniformidad en peso .....	82
7.2. Diámetro, espesor y densidad.....	82
7.3. Dureza.....	83
7.4. Contenido de compuesto activo.....	83
7.5. Tiempo de desintegración in vitro .....	83
7.6. Tiempo de desintegración in vivo y aceptabilidad sensorial .....	83
Resultados y discusión .....	84

1. Efecto de la temperatura y el grado de sobresaturación sobre el proceso de co-cristalización de zinc en matrices de sacarosa.....	84
2. Contenido de zinc de los polvos y eficiencia de encapsulación .....	84
3. Análisis morfológico .....	85
4. Estabilidad térmica .....	86
5. Análisis de interacciones mediante FTIR .....	87
6. Propiedades de flujo .....	88
7. Patrones de difracción de rayos X .....	89
8. Estabilidad de los polvos con zinc en el almacenamiento.....	91
9. Propiedades de compactibilidad .....	93
10. Propiedades de las formulaciones de las tabletas .....	94
11. Propiedades fisicoquímicas de las tabletas .....	94
12. Evaluación sensorial de las tabletas.....	96
Conclusiones parciales .....	98
Capítulo 4. SISTEMAS DE CO-VEHICULIZACIÓN DE ZINC Y EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE.....	99
Introducción.....	99
Materiales y métodos.....	100
1. Preparación de polvos con zinc y extracto de yerba mate mediante co-cristalización en matrices de sacarosa .....	100
2. Caracterización de los polvos con zinc y extracto de yerba mate .....	100
3. Formulación y preparación de los comprimidos .....	101
4. Caracterización de las tabletas.....	101
Resultados y discusión .....	102
1. Eficiencia de encapsulación y contenido de compuestos activos de los polvos.....	102
2. Contenido de humedad, actividad acuosa y análisis SEM de los polvos con zinc y extracto de yerba mate.....	104
3. Estabilidad térmica y patrones de difracción de rayos X .....	105
4. Análisis de interacciones mediante FT-IR.....	106
5. Propiedades de flujo de los polvos con zinc y extracto de yerba mate .....	107
6. Estabilidad fisicoquímica de los polvos con zinc y extracto de yerba mate.....	107
7. Tabletadas comprimidas con zinc y extracto de yerba mate .....	109
7.1. Propiedades de las formulaciones de los comprimidos .....	109
7.2. Propiedades físicas de los comprimidos.....	110

7.3. Contenido de compuestos activos de las tabletas .....	111
Conclusiones parciales .....	113
Capítulo 5. SISTEMAS COMPARTIMENTALIZADOS PARA CO-VEHICULIZACIÓN DE ZINC Y ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE.....	114
Introducción.....	114
Materiales y métodos.....	116
1. Preparación de los sistemas compartimentalizados.....	116
1.1. Preparación y caracterización de los almidones cargados con zinc .....	117
1.2. Preparación de los comprimidos compartimentalizados .....	118
2. Caracterización de los comprimidos compartimentalizados .....	119
3. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> .....	119
Resultados y discusión .....	121
1. Almidones cargados con zinc .....	121
2. Tabletillas compartimentalizadas con zinc y extracto de yerba mate.....	127
2.1. Compactibilidad de los polvos con extracto de yerba mate .....	127
2.2. Contenido de humedad y fluidez de las formulaciones de los comprimidos .....	128
2.3. Efecto de la concentración de almidón sobre la dureza de los comprimidos .....	128
2.4. Propiedades de las tabletas .....	129
3. Estudios de liberación.....	131
4. Evaluación sensorial de las tabletas.....	133
Conclusiones parciales .....	135
Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES.....	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática del proceso de daño oxidativo por acción de radicales libres. ....	1
Figura 1.2. Principales compuestos bioactivos participantes del sistema antioxidante humano. ....	3
Figura 1.3. Esquema general del proceso de autoxidación de lípidos. ....	8
Figura 1.4. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación .....	11
Figura. 2.1. Estructura química de los principales compuestos fenólicos y las xantinas presentes en la yerba mate (hojas e infusión). ....	20
Figura 2.2. Fundamento del método del DPPH. ....	23
Figura 2.3. Fundamento del método de FRAP .....	24
Figura 2.4. Actividad inhibitoria frente al radical DPPH del extracto acuoso de yerba mate en función de su concentración de polifenoles totales. ....	28
Figura 2.5. Actividad reductora de iones férricos del extracto de yerba mate en función de su concentración de polifenoles totales. ....	29
Figura 2.6. Cromatograma HPLC del extracto acuoso de yerba mate ( $\lambda=270$ nm) .....	30
Figura 2.7. Espectro de infrarrojo del extracto seco de yerba mate. ....	31
Figura 2.8. Patrón de difracción de rayos X del extracto seco de yerba mate. ....	32
Figura 2.9. Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del extracto seco de yerba mate. ....	33
Figura 2.10. Isotherma de adsorción del extracto seco de yerba mate. ....	34
Figura 2.11. Clasificación del comportamiento de isothermas de sorción .....	34
Figura 2.12. Representación de la estructura de moléculas de sacarosa y glucosa. ....	36
Figura 2.13. Proceso de obtención de antioxidantes de yerba mate encapsulados mediante co-cristalización en matrices de sacarosa. ....	37
Figura. 2.14. Fundamento del método enzimático secuencial GOD-POD para la determinación de glucosa. ....	39
Figura 2.15. Cámara cilíndrica rotativa para medición de ángulo de reposo dinámico del banco para el estudio del manejo de sólidos. ....	42
Figura 2.16. Planilla utilizada en la prueba de aceptabilidad por atributos de las bebidas refrescantes. ....	46
Figura 2.17. Límites de solubilidad y de la zona metaestable de mezclas de sacarosa y agua. ....	47

Figura 2.18. Comportamiento de la actividad antioxidante de los productos co-cristalizados en relación a su contenido de polifenoles totales. ....	50
Figura 2.19. Termogramas DSC obtenidos para el extracto seco de yerba mate (YM), los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa (CY3 y CY10) .....	52
Figura 2.20. Micrografías SEM de la muestra control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.....	54
Figura 2.21. Cinética de disolución en agua de sacarosa comercial, aglomerados control y polvos con extracto de yerba mate obtenidos por co-cristalización (CY3 y CY10). ....	56
Figura 2.22. Índices de Carr (IC) de los aglomerados control y los extractos de yerba mate encapsulados con diferentes tamaños de partícula .....	58
Figura 2.23. Espectros de infrarrojo de los aglomerados control (a) y los extractos de yerba mate al 3 (b) y al 10 % (b) co-cristalizados en matrices de sacarosa. ....	59
Figura 2.24. Isotermas de adsorción obtenidas para los aglomerados control y los extractos de yerba mate al 3 y al 10 % co-cristalizados en matrices de sacarosa. Tamaño de partícula: 0.5-1 mm.....	60
Figura 2.25. Cinética de ganancia de agua de los aglomerados control (□) y los extractos de yerba mate al 3 (○) y 10% (●) co-cristalizados en matrices de sacarosa, a 75% HR y 20°C. ....	61
Figura 2.26. Estabilidad química de los polvos con extracto de yerba mate durante el almacenamiento: (a) contenido de polifenoles totales y (b) actividad antioxidante frente al DPPH•.....	63
Figura 2.27. Cromatogramas HPLC obtenidos para los extractos de yerba mate encapsulados, antes y después de 120 días de almacenamiento a 75% HR y 20°C ( $\lambda=330$ nm).....	64
Figura 2.28. Patrones de difracción de rayos X de los polvos con extracto de yerba mate frescos y almacenados a 75% HR y 20°C. ....	67
Figura 2.29. Micrografías SEM de los polvos con extracto de yerba mate obtenidas después de 120 días de almacenamiento. ....	69
Figura 2.30. Atributos sensoriales de las bebidas con y sin extracto de yerba mate. ....	70
Figura 3.1. Mapa de prevalencia de deficiencia de zinc en niños menores de 5 años, basado en el índice de retardo de crecimiento. ....	75
Figura 3.2. Etapas involucradas durante el proceso de compactación. ....	77

Figura 3.3. Prensa hidráulica (a) y durómetro digital (b) empleados para la obtención de las curvas de compactibilidad .....	81
Figura 3.4. Imágenes de (a) máquina compresora mono-punzón, (b) matriz y punzones superior e inferior y (c) tabletas comprimidas.....	82
Figura 3.5. Micrografías SEM de los polvos con zinc y mapeo superficial de la distribución de zinc y azufre sobre los materiales. ....	85
Figura 3.6. Termogramas DSC de sulfato zinc, aglomerados control y polvos con zinc obtenidos por co-cristalización con sacarosa.....	86
Figura 3.7. Espectros IR del sulfato de zinc, los productos con zinc y los aglomerados control.....	87
Figura 3.8. Índices de Carr (IC) obtenidos para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con Zn .....	89
Figura 3.9. Patrones de difracción de rayos X del sulfato de zinc heptahidratado, los aglomerados control y los polvos con zinc.....	90
Figura 3.10. Comportamiento del contenido de humedad en el tiempo del sulfato de zinc (▲), la muestra control (○) y los productos con zinc (●) bajo condiciones de 75% HR y 20°C.....	91
Figura 3.11. Micrografías SEM de los polvos con zinc almacenados durante 30 días a 75% HR y 20 °C. ....	92
Figura 3.12. Curva de compactibilidad de los polvos con zinc .....	93
Figura 3.13. Micrografías SEM de los comprimidos con zinc y mapeo superficial de la distribución de zinc y azufre sobre los materiales. ....	96
Figura 3.14. Atributos sensoriales de las tabletas comprimidas con zinc (barras grises) y de los comprimidos preparados con una mezcla física de los ingredientes (barras negras). ...	97
Figura 4.1. Cromatogramas HPLC de los polvos con zinc y extracto yerba mate (CYZn). Longitud de onda de detección: cafeína: 275 nm, ácido clorogénico: 330 nm y rutina: 360 nm. ....	102
Figura 4.2. Distribución de zinc y azufre sobre la superficie de los polvos con zinc y extracto de yerba mate determinada mediante SEM y microanálisis de EDX.....	104
Figura 4.3. Termogramas DSC de los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn) obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.....	105
Figura 4.4. Espectro de infrarrojo de los productos con zinc y extracto yerba mate obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.....	106

Figura 4.5. Contenido de humedad en función del tiempo de la muestra control (□) y los productos con zinc y extracto de yerba mate (■) bajo condiciones de 75% HR y 20°C...	107
Figura 4.6. Micrografías SEM de los polvos con zinc y extracto de yerba mate antes y después de almacenados 30 días a 75% HR y 20°C.....	108
Con respecto al contenido de compuestos activos, n.....	108
Figura 4.7. Contenido de polifenoles totales (barras negras) y actividad antioxidante (barras grises) de los polvos con zinc y extracto de yerba mate antes y después de almacenados 30 días a 75% HR y 20°C. ....	109
Figura 4.8. Distribución de zinc y azufre en los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate determinada mediante SEM y microanálisis de EDX. ....	111
Figura 5.1. Representación esquemática del proceso de producción de tabletas compartimentalizadas con extracto de yerba mate y zinc. ....	116
Figura 5.2. Micrografías de gránulos intactos de almidón de maíz nativo y cargado con zinc (a y c) y de secciones transversales (b y d), respectivamente.....	122
Figura 5.3. Distribución de zinc y azufre sobre los gránulos de los almidones vehículo..	123
Figura 5.4. Patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y los vehículos cargados con zinc.....	124
Figura 5.5. Espectros IR del almidón nativo y los almidones cargados con zinc. ....	125
Figura 5.6. Curva de compactibilidad de los polvos con extracto de yerba mate obtenidos por co-cristalización en matrices de sacarosa.....	127
Figura 5.7. Dureza de los comprimidos obtenidos a una fuerza de compresión de 9.8 kN. ....	128
Figura 5.8. Micrografías SEM de los comprimidos obtenidos con las formulaciones TY3. ....	131
Figura 5.9. Cinética de liberación de polifenoles de yerba mate desde los comprimidos compartimentalizados.....	132
Figura 5.10. Cinética de liberación de zinc desde los vehículos de almidón (Δ) y los comprimidos compartimentalizados (●).....	133
Figura 5.11. Atributos sensoriales de las tabletas comprimidas con extracto de yerba mate. ....	134

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales compuestos fenólicos presentes en alimentos.....	5
Tabla 1.2. Principales fuentes dietarias de compuestos antioxidantes .....	7
Tabla 1.3. Principales materiales encapsulantes empleados para la protección de ingredientes alimentarios y farmacéuticos. ....	10
Tabla 1.4. Métodos de encapsulación comúnmente empleados en las industrias .....	12
alimentarias y farmacéuticas. ....	12
Tabla 1.5. Estudios realizados empleando la co-cristalización en matrices de sacarosa para la encapsulación de compuestos activos.....	16
Tabla 2.1. Contenido de materia seca y concentración de polifenoles totales del .....	27
extracto de yerba mate.....	27
Tabla 2.2. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína presentes en el.....	30
extracto acuoso de yerba mate.....	30
Tabla 2.3. Parámetros de los modelos matemáticos ajustados para la isoterma de sorción del extracto seco de yerba mate.....	35
Tabla 2.4. Formulaciones usadas para obtención de los polvos con antioxidantes de yerba mate mediante co-cristalización .....	38
Tabla 2.5. Formulaciones de bebidas refrescantes con y sin extracto antioxidante de .....	44
yerba mate en polvo.....	44
Tabla 2.6. Propiedades térmicas de los polvos con antioxidantes de yerba mate medidas por calorimetría diferencia de barrido (DSC).....	53
Tabla 2.7. Atributos de color de los aglomerados control y los polvos con.....	55
extracto de yerba mate.....	55
Tabla 2.8. Propiedades de flujo de los aglomerados control y de los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.....	57
Tabla 2.9. Higroscopicidad (%) de los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate.....	62
Tabla 2.10. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína de los polvos con extracto de yerba mate antes y después de almacenados, determinadas mediante HPLC. ....	66
Tabla 3.1. Valores de ingesta diaria recomendada de zinc en función de la edad, el sexo y situación fisiológica.....	74
Tabla 3.2. Propiedades de flujo del sulfato de zinc, las muestras control y los polvos con zinc. ....	88

Tabla 3.3. Propiedades físicas de los comprimidos con zinc .....	95
Tabla 4.1. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína, determinadas por HPLC, presentes en los polvos con extracto yerba mate (CY10) y con extracto y zinc (CYZn)..	103
Tabla 4.2. Propiedades fisicoquímicas de los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate. ....	110
Tabla 4.3. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína de los comprimidos con extracto de yerba mate y zinc. ....	112
Tabla 5.1. Estudios reportados en literatura referentes a almidones funcionalizados con compuestos activos. ....	115
Tabla 5.2. Formulaciones de los comprimidos obtenidos a partir de polvos con extracto de yerba mate y sus mezclas con almidón de maíz. Peso de un comprimido= 450 mg. ....	118
Tabla 5.3. Señales identificadas en los espectros de IR del almidón nativo y los almidones cargados con zinc.....	126
Tabla 5.4. Propiedades de los comprimidos control (mezcla 80:20, sacarosa: almidón), con extracto de yerba mate (TY3) y con zinc y extracto de yerba mate (TZY).....	129
Tabla 5.5. Contenido de compuestos activos de los comprimidos con extracto de yerba mate (TY3) y con zinc y extracto de yerba mate (TZY). ....	130

# Capítulo 1. ESTADO DEL ARTE

## 1. Compuestos antioxidantes y su importancia para la salud

El balance entre la generación de especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante del organismo es fundamental para mantenerse en estado saludable. Sin embargo, durante este proceso puede producirse un desequilibrio a favor de las sustancias prooxidantes, desencadenando múltiples reacciones que pueden llegar a ocasionar la muerte celular (Fig. 1.1.).

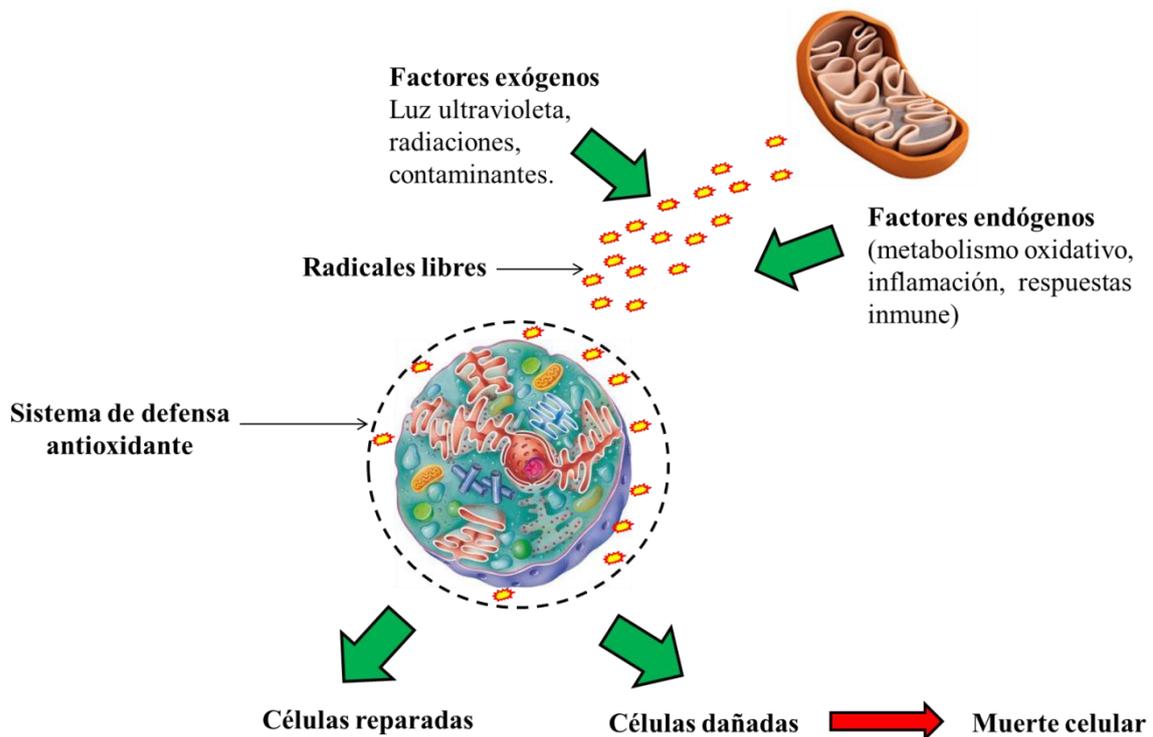


Figura 1.1. Representación esquemática del proceso de daño oxidativo por acción de radicales libres. Adaptado de Kryston y col. (2011).

El oxígeno es un elemento importante y esencial para el adecuado funcionamiento del sistema inmune, que participa en muchas reacciones del metabolismo celular, intercelular e intracelular. Esta molécula se encuentra generalmente en su forma más estable, es decir en estado triplete ( $O_2$ ). Sin embargo, mediante diferentes procesos bioquímicos y enzimáticos, se puede generar la formación de compuestos intermediarios parcialmente reducidos, conocidos como especies reactivas al oxígeno (ERO). Dichas especies oxigénicas pueden ser clasificadas en dos grupos (Halliwell, 2001):

- Radicales libres: átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Además, una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que puede llegar a ocasionar la destrucción del sustrato. Ejemplos: ión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ).
- No radicales: sustancias que a pesar de no ser considerados radicales por definición, presentan una alta reactividad, por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

Además se pueden formar compuestos mediante combinación del oxígeno con otros átomos o moléculas, tales como: radical alcohoxilo ( $RO^{\bullet}$ ), radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), triclorometilo ( $CCl_3^{\bullet}$ ), entre otros.

La mayoría de las ERO son producidas continuamente en el organismo, principalmente a nivel mitocondrial, debido al escape de electrones desde la cadena de transporte de los mismos o por reacciones catalizadas por metales de transición tales como el hierro y el cobre. Las ERO pueden ser generadas también por fuentes exógenas tales como: el humo del cigarrillo, la radiación UV, los contaminantes ambientales, el metabolismo de fármacos, la acción de células del sistema inmunológico, o dietas deficientes en minerales y compuestos antioxidantes (Halliwell, 2001).

Varias enfermedades han sido relacionadas con la acción de los radicales libres incluyendo isquemia cerebral y cardíaca, aterosclerosis, diabetes, cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas y el proceso de envejecimiento (Halliwell, 2001; Kryston y col., 2011). De acuerdo a lo informado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) las enfermedades crónicas son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes (WHO, 2005).

Los seres vivos poseen un sistema de defensa antioxidante que permite retardar o prevenir el daño oxidativo. Este se encuentra constituido por varias sustancias endógenas (enzimas primarias y secundarias, glutatión y coenzima Q10) y exógenas (compuestos fenólicos, carotenoides, aminoácidos, péptidos, proteínas, vitaminas y minerales), que actúan en forma individual, sinérgica y/o cooperativa (Fig. 1.2) (Amasheh y col., 2009; Carocho y Ferreira, 2013; Hersh, 1999; Jacobs y col., 2009).

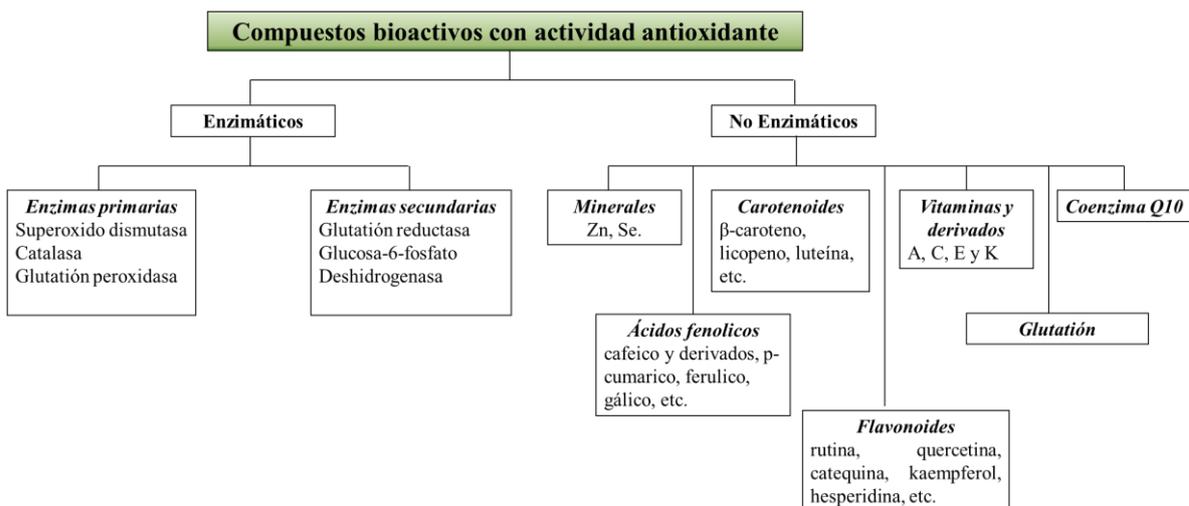


Figura 1.2. Principales compuestos bioactivos participantes del sistema antioxidante humano. Fuente: Carocho y Ferreira (2013).

### 1.1. Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes endógenos constituyen la primera línea de defensa contra la generación de ERO. Entre ellos se destacan la superóxido dismutasa que cataliza la conversión de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , la glutatión peroxidasa que evita la formación de peróxidos y la catalasa que promueve la conversión de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ . El glutatión es un tripéptido compuesto por los aminoácidos cisteína, ácido glutámico y glicina, que participa como co-sustrato de la enzima glutatión peroxidasa. La coenzima Q10 actúa como antioxidante a nivel celular, estabilizador de las membranas y en el proceso de respiración celular aeróbica, generando energía en forma de ATP. A pesar de la alta eficiencia antioxidante de los compuestos endógenos, su acción no es siempre suficiente por lo que se requiere el consumo de antioxidantes desde la dieta para mantener los niveles de radicales libres en valores adecuados (Carocho y Ferreira, 2013; Halliwell, 2001).

## *1.2. Antioxidantes dietarios*

- *Vitaminas*

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de los procesos metabólicos. Las vitaminas A, C y E son consideradas las de mayor actividad antioxidante. La vitamina A puede ser ingerida en la dieta como vitamina A preformada (retinol) o como carotenoides (precursores de la vitamina A). Los carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno), son considerados altamente efectivos en el secuestro del oxígeno singlete y los radicales peroxilo. La vitamina C (ácido ascórbico) es eficaz en la captación de los radicales anión superóxido e hidroxilo, así como en la neutralización del peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y óxido de nitrógeno reactivo. La vitamina E (tocoferoles) protege los ácidos grasos altamente insaturados presentes en las membranas celulares y subcelulares, así como otros compuestos reactivos (por ejemplo las vitaminas A y C) del daño oxidativo que pudiesen sufrir, al actuar como trampas de radicales libres. También se ha sugerido que los tocoferoles juegan un papel importante en la respiración celular y en la biosíntesis del ADN y de la coenzima Q10 (Carocho y Ferreira, 2013; Hercberg y col., 1998).

- *Minerales*

Los minerales tienen numerosas funciones en el organismo humano y juegan un rol fundamental en el sistema inmune. Estos son requeridos en muy bajas concentraciones; sin embargo, su carencia desencadena desórdenes fisiológicos graves (WHO y FAO, 2004). Los minerales de mayor importancia para el sistema antioxidante son el zinc y el selenio (Carocho y Ferreira, 2013). Estos no actúan directamente en la captura de radicales libres, sino que son considerados cofactores enzimáticos. Por su parte el zinc también actúa como inhibidor de las enzimas NADPH oxidasas, asociadas a la membrana plasmática y a la producción de radical superóxido. Además, este mineral induce la producción de metalotioneínas, las cuales son secuestradoras de metales pesados y radicales libres (Prasad y col., 2004; Salgueiro y col., 2000).

- *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos contribuyen a la estabilidad oxidativa de los alimentos de origen vegetal y son en parte responsables de algunas propiedades organolépticas, como amargor, astringencia, color, sabor y olor (Moure y col., 2001).

En la actualidad se conocen más de 8.000 estructuras fenólicas diferentes incluyendo moléculas simples y compuestos altamente polimerizados. Estos compuestos se caracterizan por presentar al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (Brewer, 2011; Pokorny y col., 2001). La elevada actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido atribuida a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. Además muchos de ellos poseen capacidad de captar iones metálicos como Fe y Cu (Carocho y Ferreira, 2013; Khlebnikov y col., 2007).

En la Tabla 1.1 se muestran los principales tipos de compuestos fenólicos presentes en alimentos (Arranz Martinez, 2010). La bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos, y por lo tanto sus efectos sistémicos, dependerán de la estructura de la matriz alimentaria y de su concentración (Parada y Aguilera, 2007). En este sentido, los flavonoides y los ácidos fenólicos son considerados los compuestos antioxidantes más abundantes y con mayores beneficios para la salud (Brewer, 2011).

Tabla 1.1. Principales compuestos fenólicos presentes en alimentos

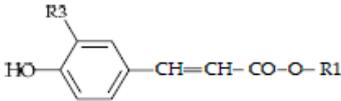
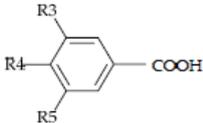
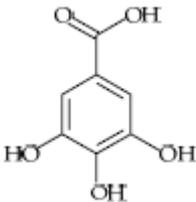
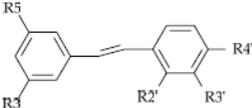
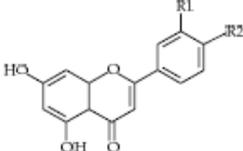
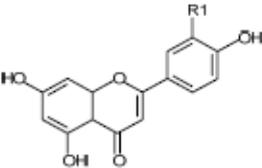
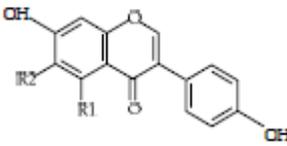
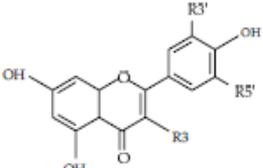
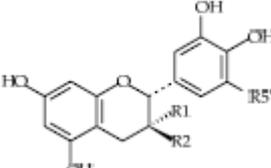
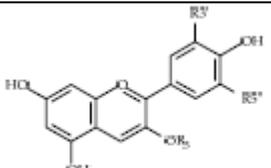
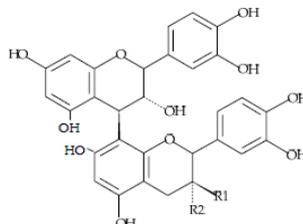
Fuente	Estructura química	Ejemplos
Ácidos hidroxinámicos		Clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, sinápico, trans-cinámico.
Ácidos hidroxibenzoicos		p-hidroxibenzoico, gálico, siríngico, vanílico, elágico, tánico.
Taninos hidrolizables		Oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxinámicos

Tabla 1.1 (Continuación). Principales compuestos fenólicos presentes en alimentos

Fuente	Estructura química	Ejemplos
Estilbenos		Resveratrol, piceida, piceanol
Flavanonas		Hesperetina, naringenina, naringina, hesperidina, floridcina.
Flavonas		Apigenina, luteolina.
Isoflavonas		Diacina, genistina, genisteína, daiceína.
Flavonoles		Rutina, quercetina, miricetina, kaempferol.
Flavanoles		Catequina, epicatequina, galocatequina, epicatequin galato, epigalocatequin galato, galocatequin galato.
Antocianidinas		Cianidina, delfinidina, petunidina, malvidina.
Taninos condensados		Dímeros, oligómeros y polímeros.

Las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta son las frutas y las verduras. Otras fuentes importantes de estos compuestos son los cereales y algunas bebidas como el té, café, vino y cerveza (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Principales fuentes dietarias de compuestos antioxidantes

<b>Fuente</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Compuestos antioxidantes</b>
Frutas y hortalizas	Manzana, guayaba, pasas de uva, arándanos, brócoli, berenjena.	Ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles y tocotrienoles, taninos.
Hierbas y especias	Romero, salvia, orégano, tomillo.	Ácido rosmarínico, cárnosol, ácido carnósico, rosmanol, isorosmanol.
Cereales y leguminosas	Arroz, maíz, centeno, sorgo, trigo.	Ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles y tocotrienoles, etc.
Oleaginosas	Oliva, maíz, canola, mostaza, chía, lino, maní.	Carotenos, tocoferoles y tocotrienoles, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos.
Té	Té verde, té negro y té oolong.	Catequinas, teaflavinas, ácidos fenólicos.

De acuerdo a la WHO la baja ingesta de frutas y verduras se encuentra entre los principales 10 factores de riesgo de mortalidad; alrededor de 1.7 millones (2.8%) de las muertes en todo el mundo son atribuibles al bajo consumo de estos alimentos. Por lo anterior, esta organización actualmente recomienda un consumo de frutas y hortalizas de por lo menos 400 g/día (WHO, 2002). Sin embargo, en la mayoría de países en vía de desarrollo la ingesta de estos productos es muy baja, por lo que se requiere incentivar su consumo y el diseño de nuevos productos con un alto aporte de compuestos bioactivos (Saura-Calixto y Goñi, 2006).

## **2. Aplicaciones de los compuestos antioxidantes en la industria de alimentos**

Los antioxidantes son utilizados no sólo como ingredientes funcionales sino también para aumentar la vida útil de los productos. La oxidación de las grasas es la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos. Esta reacción produce cambios organolépticos (olor, sabor, color y textura), nutricionales (degradación de algunas vitaminas y de ácidos grasos poliinsaturados) y pérdida de actividad funcional. Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud (Fennema y Tannenbaum, 1996).

La oxidación lipídica es autocatalítica; una vez iniciada, se autopropaga y autoacelera. Esta reacción es compleja; sin embargo, los mecanismos involucrados pueden ser simplificados en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación (Fig. 1.3).

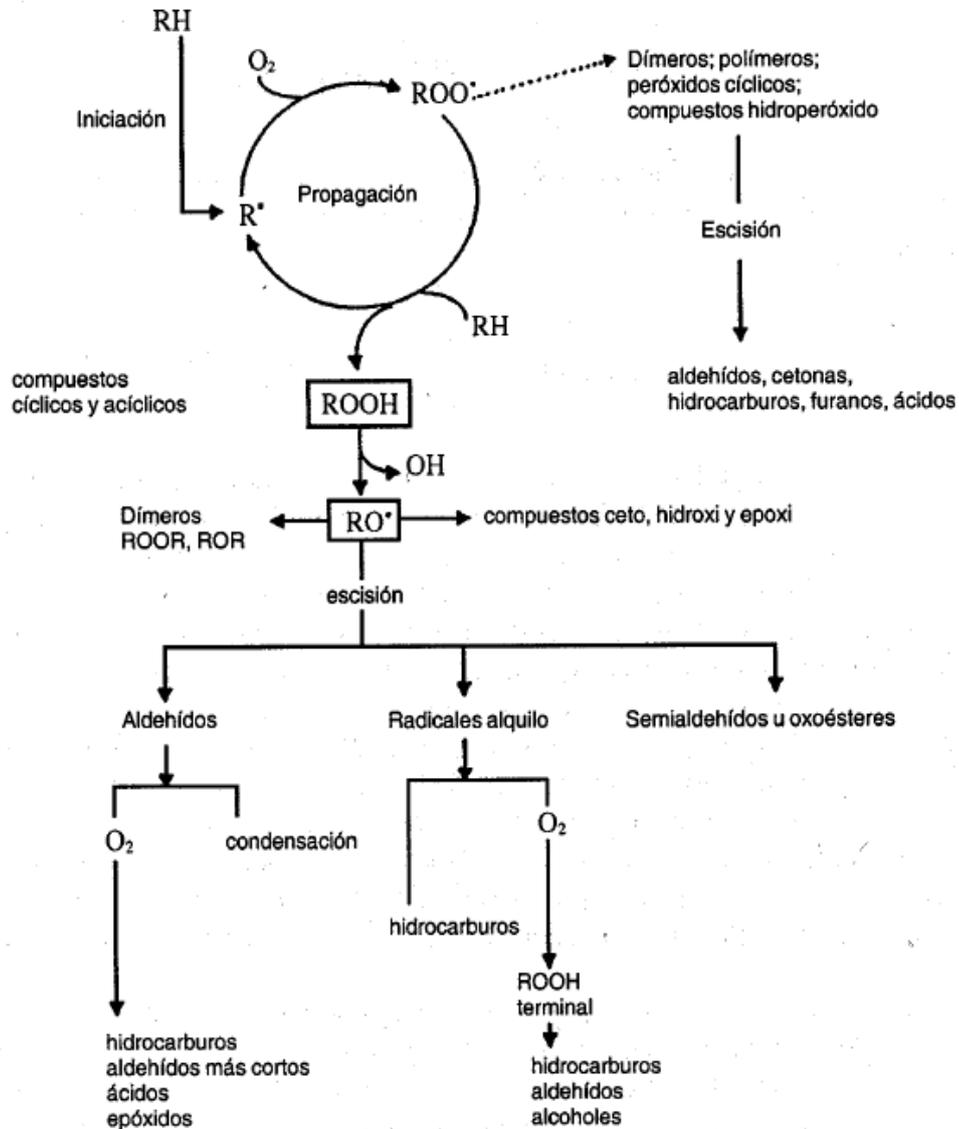


Figura 1.3. Esquema general del proceso de autooxidación de lípidos. Fuente: Fennema y Tannenbaum (1996).

El uso de antioxidantes constituye una de las principales estrategias empleadas por la industria alimentaria para prevenir la oxidación lipídica. Estos compuestos son añadidos comúnmente en aceites y grasas, mayonesas, productos cárnicos, galletas, chicles, bebidas de frutas, productos de panadería, frutos secos, entre otros (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Los antioxidantes pueden actuar mediante distintos mecanismos de reacción con respecto a la secuencia de reacciones del proceso de oxidación lipídica: a) disminuyendo la concentración de oxígeno, b) interceptando al oxígeno singulete, c) atrapando (“scavenging”) radicales libres tales como los radicales hidroxilo (OH•), d) por unión con metales (agentes prooxidantes), e) favoreciendo la descomposición de productos primarios a compuestos no radicalarios, f) por interrupción de la cadena de iniciación o propagación transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos (L•) y peroxilo (LOO•) (Guiotto y col., 2014; Pokorny y col., 2001).

Los aditivos sintéticos butil-hidroxi-tolueno (BHT) y butil-hidroxi-anisol (BHA) son los antioxidantes mayormente empleados por la industria, debido a su alto grado de estabilidad, eficacia y ventaja económica. Sin embargo, estudios toxicológicos han vinculado estos compuestos con efectos negativos sobre la salud (Moure y col., 2001). Por esa razón, el interés por el uso de sustancias de origen natural se ha incrementado en los últimos años. Los antioxidantes naturales mayormente empleados en la industria alimentaria son los tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol) y el ácido ascórbico y sus derivados (ascorbato sódico y cálcico y palmitato de ascorbilo). Estos han demostrado una alta eficiencia como retardantes de reacciones de deterioro de varios productos (Wanasundara y Shahidi, 2005). Otro grupo de sustancias de interés industrial son los extractos de plantas, siendo el extracto de romero uno de los más empleados a nivel industrial debido a su alto contenido de ácido rosmarínico, que presenta una actividad antioxidante similar a la de BHA y BHT (Brand-Williams y col., 1995; Hernández-Hernández y col., 2009). Otros extractos han demostrado una alta efectividad antioxidante; sin embargo, presentan limitaciones debido a su baja estabilidad térmica y química y a sus características sensoriales particulares (Ares y col., 2009; Pokorný, 1991).

### **3. Encapsulación de compuestos bioactivos**

La encapsulación es definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos dentro de una matriz; generando de esta forma un microambiente capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior del sistema (Borgogna y col., 2010).

Algunos de los propósitos de aplicar una técnica de encapsulación son (Champagne y Fustier, 2007; Desai y Jin Park, 2005; Onwulata, 2011):

- Proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente (calor, aire, luz, humedad, etc.)
- Modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipuleo. Por ejemplo, reducir la higroscopicidad, mejorar la fluidez, evitar la aglomeración (“caking”), distribuir el material uniformemente en una mezcla, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros.
- Enmascarar sabores desagradables.
- Separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen entre sí.
- Liberación controlada de un compuesto activo bajo condiciones específicas (pH, temperatura, etc.).

Los materiales encapsulantes más usados para la protección de ingredientes en las industrias alimentarias y farmacéuticas son las biomoléculas, debido a que son abundantes, no tóxicas y poseen baja alergenicidad (Tabla 1.3). Estos productos pueden emplearse en forma individual o combinados con otros materiales, a fin de generar sinergias favorables (Wandrey y col., 2010).

Tabla 1.3. Principales materiales encapsulantes empleados para la protección de ingredientes alimentarios y farmacéuticos.

<b>Materiales</b>	<b>Ejemplos</b>
Proteínas	Albúmina, caseínatos, gelatina, gluten, péptidos, proteína de soja, proteínas de suero
Azúcares simples	Sacarosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, trehalosa
Polisacáridos y gomas	Alginatos, quitosano, almidones nativos y modificados (maíz, papa, etc.), ciclodextrina, maltodextrina, agar, carragenato, pectina, goma arábiga
Lípidos	Aceites y grasas comestibles, monoglicéridos, diglicéridos, liposomas, lecitina.
Celulosas	Carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa, ftalato-acetato de celulosa, ftalato-butirato-acetato de celulosa

Se pueden obtener diversos tipos de sistemas dependiendo de los materiales y del procedimiento de encapsulación empleado (Fig. 1.4). En los sistemas reservorio el compuesto activo se encuentra en el interior recubierto por una o varias capas concéntricas del material de pared (Fig. 1.4a). La velocidad de liberación de estos sistemas depende del grosor, el área y la permeabilidad del agente encapsulate empleado.

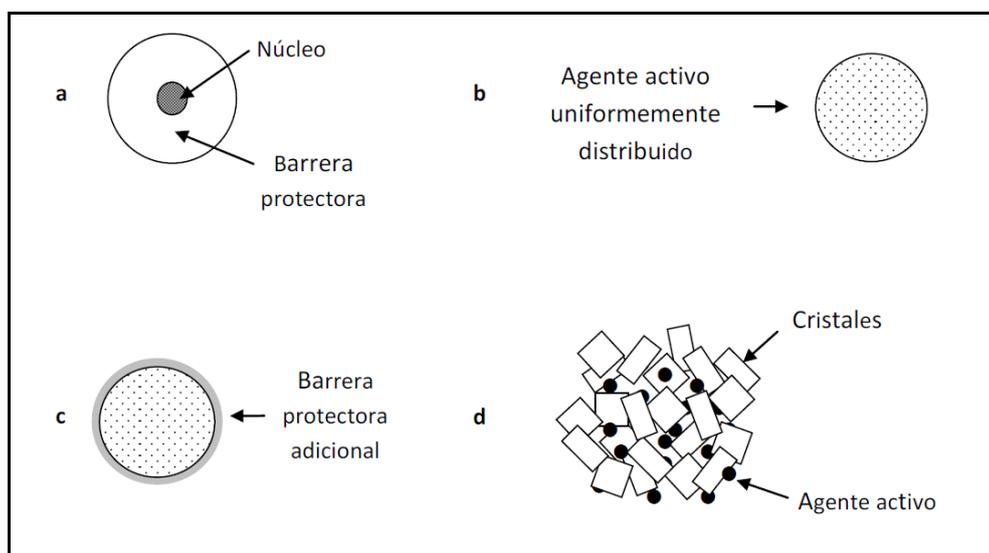


Figura 1.4. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz, c) mixto y d) aglomerados. Fuente: Deladino y col. (2007b).

Los sistemas tipo matriz consisten en una mezcla homogénea del ingrediente activo y el material encapsulante (Fig. 1.4 b). La liberación en estos sistemas depende del tipo del material de la matriz, la forma de la cápsula y la cantidad de compuesto activo. Los sistemas mixtos (Fig. 1.4 c) pueden ser obtenidos adicionando una capa extra sobre los encapsulados tipo matriz para aumentar la protección del agente activo o retardar su liberación. Los aglomerados ofrecen una amplia área superficial para contener compuestos activos, facilitar el manipuleo y mejorar su aptitud frente al almacenamiento (Fig. 1.4 d).

### 3.1. Técnicas de encapsulación

Los métodos empleados para la producción de productos encapsulados pueden ser clasificados en tres grupos: físicos (secado por atomización, secado por enfriamiento, extrusión, liofilización, lecho fluidizado y co-cristalización), químicos (formación de complejos de inclusión y polimerización interfacial) y físico-químicos (coacervación,

gelificación iónica y atrapamiento con liposomas). En la Tabla 1.4 se describen algunos de los métodos de encapsulación más utilizados en las industrias alimentarias y farmacéuticas.

Tabla 1.4. Métodos de encapsulación comúnmente empleados en las industrias alimentarias y farmacéuticas.

<b>Técnica</b>	<b>Principio</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>Aplicaciones</b>
Secado por atomización	Atomización y secado con aire caliente de una dispersión homogénea del compuesto bioactivo en un agente encapsulante	Tecnología flexible, económica y que permite trabajar en continuo. Tiempo de proceso corto	Falta de uniformidad de microesferas, limitación en la elección del material encapsulante, las altas temperaturas pueden degradar compuestos bioactivos	Leche en polvo, sabores, aromas, bebidas instantáneas, sopas, antioxidantes, colorantes
Secado por enfriamiento o congelación	Es una variante del secado por atomización que emplea aire frío.	Permite la encapsulación de compuestos sensibles a las altas temperaturas	Falta de uniformidad de microesferas, limitación en la elección del material encapsulante	Vitaminas, minerales, acidulantes, sopas, alimentos con alto contenido graso
Extrusión	Paso de una emulsión formada por el material activo y el agente encapsulante a través de un extrusor a alta presión.	Altos rendimientos, proceso económico, permite trabajar en continuo	Limitación en la elección del material encapsulante	Sabores, bebidas instantáneas, postres, gelatinas
Gelificación iónica	Formación de capsulas por interacción iónica entre un polisacárido y un ión de carga opuesta	Método fácil y de alta versatilidad. Tamaño de partícula uniforme, no requiere solventes, ni altas temperaturas	Difícil escalado, tiempos largos de proceso	Probióticos, enzimas, aceites esenciales

Tabla 1.4 (Continuación). Métodos de encapsulación comúnmente empleados en las industrias alimentarias y farmacéuticas.

<b>Técnica</b>	<b>Principio</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>Aplicaciones</b>
Liofilización	Secado por congelación de una emulsión conteniendo el compuesto activo y un agente encapsulante	Permite la encapsulación de compuestos sensibles a las altas temperaturas	Tiempos largos de proceso, alto costo, baja estabilidad de los materiales encapsulados	Probióticos, enzimas
Recubrimiento por lecho fluidizado	El compuesto activo es suspendido mediante una corriente vertical de aire y pulverizado sobre el agente encapsulante	Partículas de forma y tamaño homogéneo. Permite el uso de una gran variedad de materiales encapsulantes	Las altas temperaturas pueden degradar compuestos bioactivos	Ácidos orgánicos (cítrico, láctico y sórbico), bicarbonato de sodio
Coacervación	Deposición del agente encapsulante alrededor del compuesto activo por atracción electrostática	Alta eficiencia, permite la encapsulación de compuestos sensibles a las altas temperaturas	Método complejo, altos costos, uso de solventes, productos inestables	Aceites esenciales, vitaminas y enzimas
Atrapamiento por liposomas	Estructuras formadas por bicapas lipídicas que rodean el material activo	Permite encapsular compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos	Uso de disolventes orgánicos	Enzimas y vitaminas
Formación de complejos de inclusión	Asociación supramolecular de un ligando dentro de un sustrato con una cavidad	Alta eficiencia de encapsulación para compuestos apolares	Poco versátil, agentes encapsulantes de alto costo	Sabores, aromas, aceites esenciales, vitaminas

Actualmente los procesos más empleados en la industria de alimentos son el secado por atomización y la extrusión, principalmente, debido al costo accesible y la producción en serie de encapsulados (Desai y Jin Park, 2005; Guin, 2004). Otra metodología comúnmente utilizada para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, cosméticos e ingredientes alimentarios; es la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (Astray y col., 2009; Del Valle, 2004; dos Santos y col., 2012)

La selección del proceso de encapsulación adecuado dependerá de múltiples factores, tales como: el tamaño partícula requerido, las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante y el compuesto activo, la finalidad del producto encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Munin y Edwards-Lévy, 2011; Onwulata, 2011).

### 3.2. Co-cristalización en matrices de sacarosa

La co-cristalización es una técnica de encapsulación relativamente nueva que ofrece una alternativa simple, económica y flexible para la protección de compuestos activos de interés alimentario y farmacéutico. En este proceso, la estructura cristalina de la sacarosa se modifica desde un cristal perfecto a aglomerados de forma irregular que ocuyen el compuesto activo (Fig. 1.5).

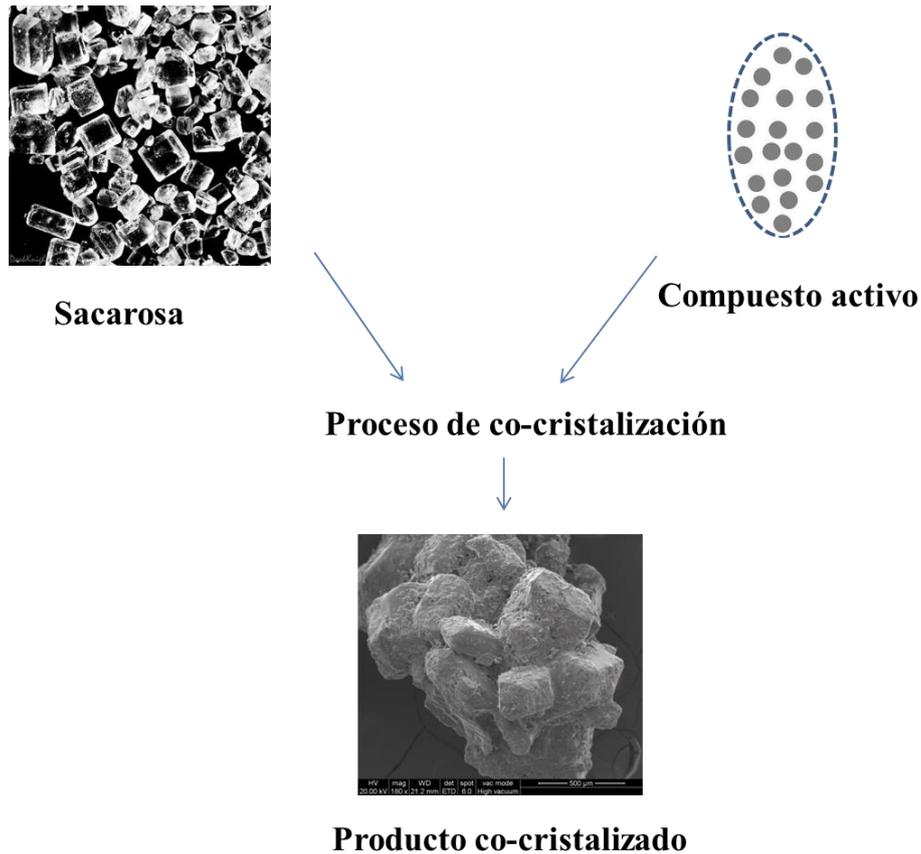
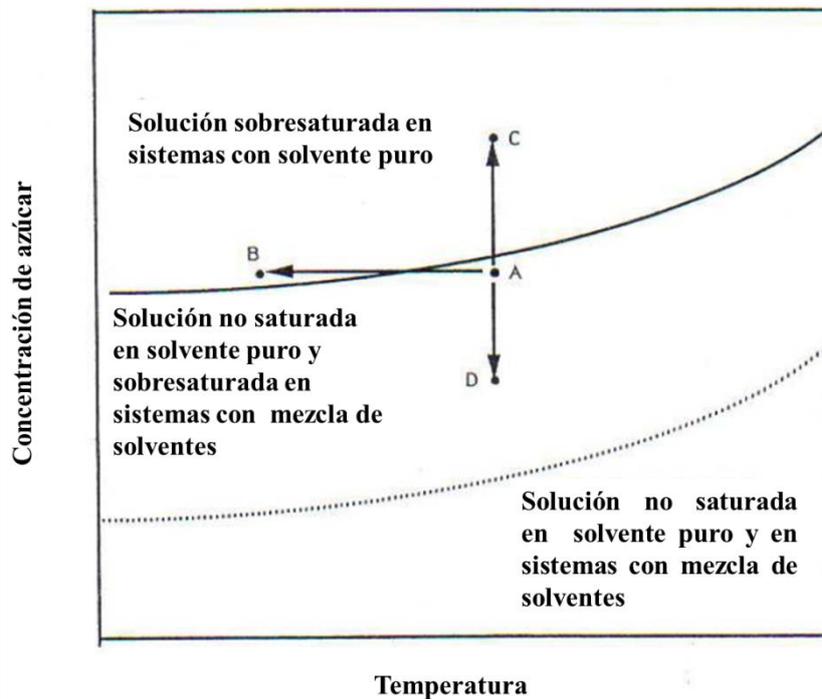


Figura 1.5. Esquema de preparación de productos co-cristalizados.

La cristalización es definida como una transición de fase de moléculas desde el estado líquido al sólido. Los cristales pueden obtenerse a partir de una solución o desde el material fundido. Para que este proceso ocurra se requiere de una fuerza impulsora dada por una diferencia de potencial entre la fase solución y el sólido cristalino (Hartel y Shastry, 1991). De acuerdo a Bhandari y Hartel (2002) y Chen y col. (1988) la sacarosa puede ser cristalizada a partir de soluciones sobresaturadas (70-80% de sólidos) o altamente concentradas (>90% de sólidos).

Una solución sobresaturada puede lograrse empleando tres diferentes estrategias las cuales son ilustradas en la Fig. 1.6 (Hartel y Shastry, 1991): i) enfriando una solución no saturada lo suficiente como para que la concentración del soluto exceda la saturación (línea AB); ii) evaporando parte del agua de la solución para aumentar la concentración de soluto por encima de la solubilidad (línea AC) o iii) adicionar otro solvente, en el que el soluto sea insoluble, de modo que la mezcla resultante tenga una nueva curva de solubilidad (línea punteada) y la concentración del soluto se encuentre ahora por encima de la concentración de saturación de la mezcla (línea AD).



Figural.6. Desarrollo de sobresaturación en soluciones de azúcar por enfriamiento (línea AB), evaporación (línea AC) o por adición de un solvente (línea AD). Fuente: Hartel y Shastry (1991).

En el proceso de co-cristalización se emplean jarabes con concentraciones entre 70 y 85°Brix (Beristain y col., 1996; Bhandari y col., 1998). Estos son concentrados por calentamiento hasta alcanzar la sobresaturación. Luego se adiciona el compuesto activo y se realiza el enfriamiento de la mezcla bajo agitación, para favorecer la cristalización espontánea (nucleación y crecimiento cristalino). De esta forma, se obtienen agregados de microcristales de 3 a 30  $\mu\text{m}$  que ocluyen el compuesto activo en el interior de esos

microcristales o entre ellos. Finalmente, los productos son secados hasta la humedad deseada y llevados a tamaño uniforme (Awad y Chen, 1993).

Existen muy pocos estudios reportados en literatura empleando la co-cristalización en matrices de sacarosa como técnica de encapsulación. En la Tabla 1.5 se resumen algunos de los trabajos realizados. Los resultados mostraron que mediante esta metodología es posible mejorar las propiedades de algunos ingredientes tales como fluidez, solubilidad, capacidad de dispersión, humectabilidad y estabilidad química. Otra ventaja importante de esta técnica es que el calor de cristalización generado durante el proceso generalmente es suficiente para obtención de polvos con muy bajo contenido de humedad (Awad y Chen, 1993; Bhandari y Hartel, 2002).

El análisis de las variables que controlan el proceso de co-cristalización constituye un desafío para lograr la aplicación de esta técnica a escala industrial. Una de las desventajas es que algunos compuestos podrían ser degradados por efecto de la temperatura. Sin embargo, pocos estudios han sido reportados en la literatura al respecto.

Tabla 1.5. Estudios realizados empleando la co-cristalización en matrices de sacarosa para la encapsulación de compuestos activos.

<b>Compuesto encapsulado</b>	<b>Beneficios de la co-cristalización con sacarosa</b>	<b>Referencias</b>
Sabores, jugos de fruta, aceites esenciales	Mejora la capacidad de dispersión, la solubilidad y la estabilidad.	Chen y col. (1988) y Awad y Chen (1993)
Extracto de Jamaica	Retención del aroma y el sabor característico del extracto original. Buena capacidad de dispersión, solubilidad, homogeneidad y fluidez.	Beristain y col. (1994)
Aceite esencial de naranja	Bajos contenidos de humedad, alta retención de compuestos volátiles.	Beristain y col. (1996)
Miel	Buena fluidez y alta retención de compuestos volátiles.	Maulny y col. (2005) y Bhandari y col. (1998)
Glucosa y fructosa	Bajo contenido de humedad, buena resistencia a la compactación.	Bhandari y Hartel (2002) y Geary (2008)
Jugos de limón y maracuyá	Bajo contenido de humedad, buena solubilidad y fluidez.	Astolfi-Filho y col. (2005)
Sales minerales y extracto liofilizado de yerba mate	Baja higroscopicidad, buena fluidez y alta solubilidad	Deladino y col. (2007, 2010)
Oleorresinas de cardamomo	Baja higroscopicidad, alta solubilidad y buena estabilidad bajo almacenamiento	Sardar y Singhal (2013)

Los productos obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa pueden ser empleados en distintas aplicaciones:

- Ingrediente o edulcorante: chocolates, golosinas, barras de cereal, cereales para el desayuno, bebidas, entre otros.
- Mezclas secas: postres, gelatinas, mezclas con cereales, bebidas hidratantes, sales de rehidratación oral, entre otros.
- Excipientes farmacéuticos: materiales para producción de tabletas por compresión directa, polvos de rápida disolución, ingrediente para la preparación de jarabes, entre otros.

En este sentido, esta técnica constituye una estrategia útil para dar valor agregado a una gran variedad de compuestos activos de interés alimentario y farmacéutico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

1. Desarrollar productos encapsulados conteniendo minerales y antioxidantes naturales que posean buena estabilidad, características sensoriales aceptables y sean de fácil manipuleo.
2. Incorporar los productos encapsulados en sistemas para la vehiculización individual o simultánea de compuestos bioactivos dirigidos a grupos de consumidores con necesidades específicas.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar los compuestos bioactivos a estudiar: zinc y extracto de yerba mate (*Ilex paraguariensis*).
2. Encapsular los compuestos bioactivos mediante la técnica de co-cristalización en matrices de sacarosa.
3. Seleccionar las formulaciones óptimas que permitan maximizar la carga de compuestos activos, sin afectar su actividad funcional.
4. Estudiar las características macro y micro estructurales de los productos encapsulados.
5. Determinar la estabilidad fisicoquímica de los compuestos activos encapsulados durante el almacenamiento.
6. Desarrollar sistemas de dosificación de zinc y extracto de yerba mate en forma de polvos y tabletas comprimidas.

## Capítulo 2. SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE

### Introducción

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) es una planta nativa de la región subtropical de América del Sur, cultivada en Argentina, el sur de Brasil y Paraguay. Las infusiones de este producto se ingieren como bebida en proporciones de más de un litro por día por millones de personas, como mate, mate cocido o tereré. La yerba mate tiene la ventaja de ser considerada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU. (FDA, por sus siglas en inglés) como un ingrediente generalmente reconocido como seguro. El interés hacia este producto se ha incrementado rápidamente en los últimos años mostrando un gran potencial económico y expandiéndose hacia nuevos mercados internacionales.

La producción industrial de la yerba mate se realiza mediante sucesivas etapas. Una vez realizada la cosecha, las hojas se someten al proceso de “sapecado”, el cual consiste en su exposición directa al fuego a temperaturas entre 400 y 450°C durante 20-30 segundos. Este tratamiento se realiza con el fin de inactivar enzimas y reducir el contenido de humedad, previniendo de este modo la oxidación y el deterioro del color, el sabor y el aroma de las hojas. Luego se realiza un secado en el que reduce el contenido de agua por debajo del 3%. Esta operación puede realizarse en cámaras de madera o ladrillo por las cuales circula aire caliente o humo filtrado (“barbaqua”), o en túneles de secado continuos. El tiempo de este proceso varía entre 6 y 24 horas, dependiendo el tipo de tecnología empleada.

Luego del secado, las hojas se someten a un proceso de trituración denominado “canchado”, el cual facilita su manipuleo durante el transporte y estacionamiento. Posteriormente, la yerba canchada es depositada en cámaras de estacionamiento para el desarrollo del sabor, aroma y color característicos del mate. El estacionamiento puede realizarse bajo condiciones naturales de humedad relativa y temperatura durante 9-12 meses o de forma acelerada bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y flujo de aire durante 30 ó 60 días. Posteriormente, la yerba mate es triturada, zarandeada y mezclada según el uso y preferencias de cada región. Por último se realiza el envasado y estampillado del producto para su posterior distribución (Isolabella y col., 2010).

La yerba mate (hoja e infusión) es una fuente importante de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) y xantinas (cafeína, teofilina y teobromina) (Fig. 2.1). Además contiene vitaminas (C, B1 y B2) y minerales (K, Mg, Fe y Zn).

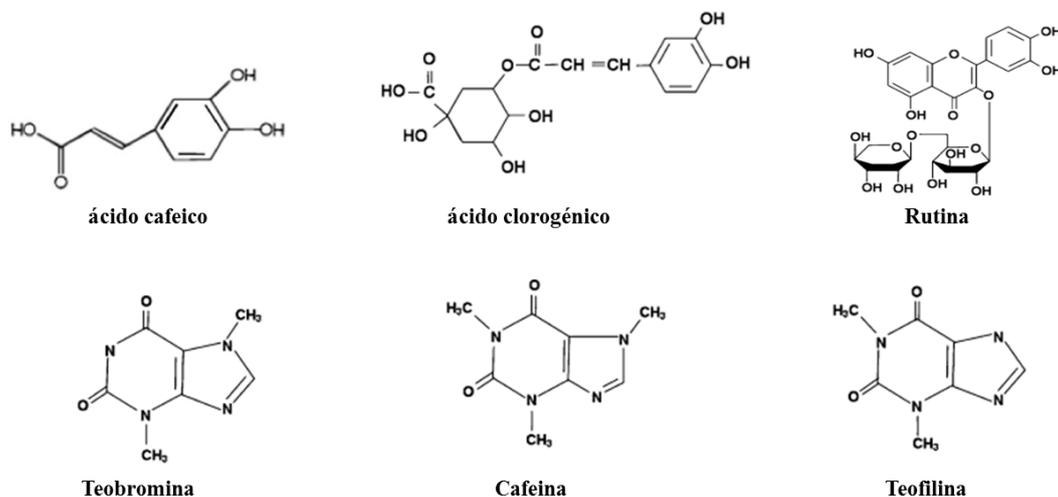


Figura. 2.1. Estructura química de los principales compuestos fenólicos y las xantinas presentes en la yerba mate (hoja e infusión). Fuente: Heck y col. (2008).

El ácido clorogénico y sus derivados son considerados los polifenoles con mayor influencia en la capacidad antioxidante del extracto de yerba mate. La aplicación de técnicas de HPLC-DAD y HPLC-MS ha permitido discriminar una gran variedad de este tipo de compuestos en dichos extractos (Berte y col., 2011; Dugo y col., 2009; Heck y González de Mejía, 2007).

Varios autores han demostrado, mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, que el extracto de yerba mate actúa como un potente antioxidante, estimulante, diurético, antimicrobiano, antiglicémico, hipocolesterolémico, adelgazante, antiinflamatorio, antirreumático, hepatoprotector, colerético, antimutagénico, entre otros (Bracesco y col., 2003; Bracesco y col., 2011; De Moraes y col., 2009; Gugliucci, 1996; Hemmerle y col., 1997; Marques y Farah, 2009; Martinet y col., 1999; Stein y col., 2005). Por esta razón, este extracto es empleado actualmente para la producción de alimentos funcionales y nutraceuticos, suplementos dietarios, fitomedicamentos, bebidas energizantes, cosméticos, productos adelgazantes, entre otros.

En sistemas alimentarios, el extracto de yerba mate ha demostrado capacidad de prevenir el deterioro oxidativo de productos con alto contenido graso, mostrando un elevado poder antioxidante inclusive a bajas concentraciones (De Campos y col., 2007; Valerga y col., 2013). Sin embargo, su sabor característico limita su incorporación en otros alimentos debido a que éste puede generar rechazo por parte de los consumidores. Además, varios autores han reportado que los extractos de yerba mate en polvo, obtenidos por secado por atomización o liofilización, presentan alta higroscopicidad, mala fluidez y baja estabilidad (Berte y col., 2011; Deladino y col., 2007a). Por lo que se requiere la búsqueda de estrategias que permitan superar dichas limitaciones.

El empleo de los alimentos como vehículos de compuestos bioactivos constituye una alternativa eficaz para disminuir el riesgo de aparición de enfermedades (Day y col., 2009; Hobbs y col., 2014; Kosaraju y col., 2008). En este sentido, la sacarosa constituye un material ideal para el transporte de ingredientes con actividad funcional, teniendo en cuenta su alto consumo y sus propiedades (baja higroscopicidad y alta solubilidad y capacidad de hidratación). Además éste azúcar permite mejorar los atributos sensoriales de los productos. Como se mencionó anteriormente, a través de la encapsulación mediante co-cristalización en matrices de sacarosa, es posible la obtención de polvos con buena fluidez, solubilidad, humectabilidad, compactibilidad y estabilidad química (Awad y Chen, 1993; Bhandari y Hartel, 2002).

Los objetivos de este capítulo fueron desarrollar sistemas de vehiculización de extracto antioxidante de yerba mate y caracterizar las matrices obtenidas. Para facilitar la comprensión del trabajo, los resultados de este capítulo se presentaran en 2 partes: en la parte I se presenta la caracterización de los extractos antioxidantes de yerba mate. Luego en la parte II se muestra el estudio del efecto del proceso de co-cristalización sobre la capacidad antioxidante y la eficiencia de encapsulación de los extractos de yerba mate. Además se muestran las propiedades tecnológicas de los productos y el análisis de la estabilidad fisicoquímica de los compuestos activos encapsulados bajo condiciones de almacenamiento acelerado. La parte II también incluye una aplicación de los extractos de yerba mate encapsulados como un ingrediente en la elaboración de una bebida con antioxidantes naturales.

# **Parte I. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)**

En esta sección se plantearon los siguientes objetivos: i) cuantificar los principales compuestos bioactivos presentes en el extracto acuoso de yerba mate; ii) evaluar su actividad antioxidante; iii) caracterizar los extractos para su posterior incorporación en los sistemas de encapsulación.

## **Materiales y métodos**

### **1. Preparación de los extractos de yerba mate**

Los extractos de yerba mate fueron obtenidos siguiendo la metodología optimizada previamente por Anbinder (2004) y Deladino (2010). Se prepararon mezclas con diferentes cantidades (3, 5 y 10 g) de yerba mate comercial (“La Merced variedad de campo”, Establecimiento Las Marías, Corrientes, Argentina) y 100 mL de agua destilada. Estas fueron llevadas a un baño termostático (Viking, Argentina) a 90°C durante 40 min. El producto obtenido se filtró y se enfrió previo al análisis.

Para los ensayos de FTIR, DSC, rayos X y las isotermas de adsorción se emplearon extractos en polvo obtenidos por secado en estufa de convección forzada (SanJor, Argentina) a 37°C durante 72 h.

### **2. Contenido de materia seca**

Las muestras de extractos líquidos (5 mL) se sometieron a secado a 105°C hasta peso constante (AOAC, 1998) empleando una Balanza de humedad Mettler LP 16 (Suiza). Los resultados fueron expresados como g residuo sólido/100 ml de extracto.

### **3. Contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales (PT) fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Esta prueba está basada en la oxidación de los grupos fenólicos con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolíbldico. Como resultado de la reacción se forma un complejo verde azulado, el cual tiene un máximo de absorbancia entre 725 y 750 nm.

Para el análisis se tomaron 0.2 mL de extracto diluido de yerba mate y se colocaron en un tubo de ensayo conteniendo 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% (p/v) (Anedra, Argentina), se dejó reposar durante 2 min y a continuación se agregaron 0.2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Anedra, Argentina; diluido 1:1). La mezcla se agitó mediante vórtex y luego de un tiempo de reacción de 30 min, se procedió a la medida de absorbancia a 725 nm empleando un espectrofotómetro (Shimadzu Double Beam Spectrophotometer UV-150-02, Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón). La calibración del método se realizó utilizando como estándar ácido clorogénico (AC) (Fluka, EE.UU.). Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido clorogénico (“mg AC”) por cantidad de muestra.

#### 4. Evaluación de la actividad antioxidante

##### 4.1. Capacidad inhibitoria frente al radical DPPH

La capacidad inhibitoria frente al radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH•) fue evaluada usando el protocolo reportado por Brand-Williams y col. (1995). Este método se basa en la reducción del radical DPPH• por acción de los compuestos antioxidantes (Fig. 2.2). La reacción produce un cambio de coloración de azul-violeta a amarillo pálido, el cual se monitorea espectrofotométricamente.

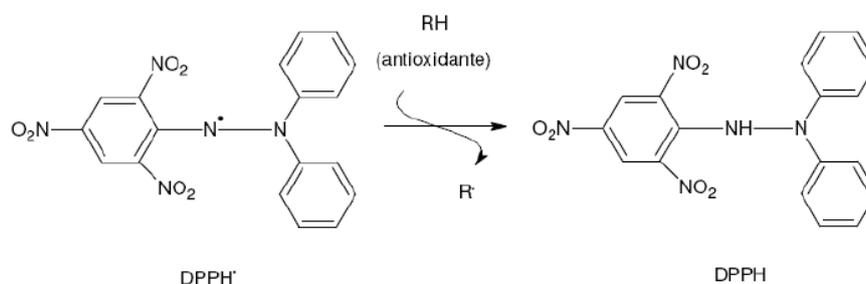


Figura 2.2. Fundamento del método del DPPH. Fuente: Brand-Williams y col. (1995).

Una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de muestra se mezcló con 3.9 mL de solución etanólica (25 mg /L) de DPPH• (Sigma-Aldrich, USA). Luego de un tiempo de reacción de 30 min se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH•, calculado con la siguiente ecuación:

$$\%I = \left( \frac{Abs_b - Abs_m}{Abs_b} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $Abs_b$  es la absorbancia de la reacción control (conteniendo todos los reactivos excepto la muestra) y  $Abs_m$  es la absorbancia de la muestra.

#### 4.2. Capacidad reductora de iones férricos (FRAP)

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el  $Fe^{+3}$  presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa,  $Fe^{+2}$  (Fig. 2.3) (Benzie y Strain, 1996).

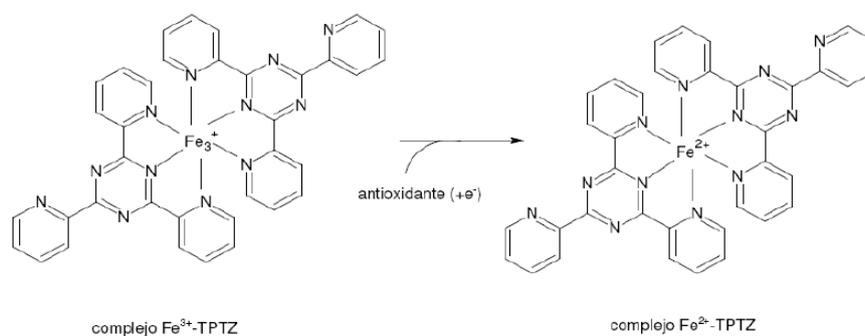


Figura 2.3. Fundamento del método de FRAP: reducción de  $Fe^{+3}$  – TPTZ a  $Fe^{+2}$  – TPTZ. Fuente: Moon y Shibamoto (2009).

Una alícuota de 50  $\mu$ L de muestra se mezcló con 1.5 mL de solución de reacción. Esta última fue preparada mezclando 25 mL de TPTZ (10 mM), 2.5 mL de solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado (20 mM) y 2.5 mL de buffer acético-acetato (300 mM, pH= 3.6) (Benzie y Strain, 1996). Luego de un tiempo de reacción de 10 min, se determinó la absorbancia 595 nm en el espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como  $\mu$ moles equivalentes de ion  $Fe^{+2}$  por cantidad de muestra.

### 5. Determinación de los principales compuestos activos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución HP 1100 (Hewlett Packard, EE.UU.), equipado con bomba binaria, inyector automático, desgasificador, detector de arreglo de diodos (DAD) y una columna Zorbax 300 SB-C18 (250 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m).

Los ensayos fueron realizados usando el método reportado por Chandra y Gonzalez de Mejia (2004). La fase móvil "A" consistió en una mezcla de metanol, agua y ácido fórmico (79.7:20:0.3) y la fase móvil "B" de una mezcla de metanol y ácido fórmico (99.7:0.3). El gradiente empleado fue: 0% B/15 min; 40% B/15 min; 75% B/10 min; 100% B/5 min.

Se prepararon soluciones stock (0.25 mg/mL) de estándares comerciales de ácido clorogénico, rutina, ácido cafeico y cafeína (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en mezclas de metanol-agua Milli-Q (50:50). Las curvas de calibración se realizaron con cuatro niveles de concentración, cada uno por duplicado. La identificación de los principales compuestos fenólicos (ác. clorogénico, ác. cafeico y rutina) y de cafeína fue realizada mediante comparación con los estándares puros y el análisis de sus espectros DAD. La detección de los compuestos se realizó a la longitud de onda de máxima absorción: cafeína a 275 nm, ácidos cafeico y clorogénico a 330 nm y rutina a 360 nm.

## **6. Identificación de los principales grupos funcionales mediante FTIR**

Se empleó un equipo Nicolet IS-10 (Thermo Scientific Inc., EE.UU.). Los extractos en polvo fueron mezclados con bromuro de potasio y molidos cuidadosamente con mortero de ágata. Los espectros fueron tomados en el modo de transmisión entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , adquiriendo 64 escaneos en promedio con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . El análisis espectral se realizó empleando el software Omnic versión 8.1. (Thermo Scientific Inc., EE.UU.).

## **7. Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ )**

La determinación de la  $T_g$  se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando un equipo Q100 (TA Instruments, EE.UU.). Se colocaron muestras de extracto seco de yerba mate (3-5 mg) en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. El equipo se calibró con un patrón de Indio. La muestras se calentaron a una velocidad de 4°C/min, desde -30 hasta 100°C.

## **8. Patrón de difracción de rayos X**

El análisis de rayos X se realizó empleando un equipo X'Pert Pro PANalytical modelo PW 3040/60 (Almelo, Holanda) provisto de un tubo con un ánodo de CuK, que emite radiación de  $\lambda=1.543$  nm, y un detector que operó con un voltaje de 40 KV y una corriente de 40 mA. Los difractogramas se obtuvieron desde  $2\theta = 3^\circ$  hasta  $2\theta = 60^\circ$ .

## 9. Isotermas de adsorción

Se empleó el método de isoterma con punto de rocío dinámico (DDI, en inglés “Dynamic Dewpoint Isotherm”). Las muestras (1-2 g) se analizaron en un analizador de sorción de vapor VSA 1020 operando a 20°C (Decagon, Inc. EE.UU.). En este equipo, la desorción y la adsorción se obtienen insertando aire seco o húmedo, respectivamente, y los cambios en la masa de la muestra se registran con una microbalanza analítica. Simultáneamente se mide la actividad de agua de la muestra, utilizando el principio del punto de rocío, por condensación del vapor de agua en un espejo enfriado. Las isotermas se representaron como el contenido de humedad en base seca (b. s.) versus la actividad acuosa de las muestras.

Varios autores han informado que este método genera resultados altamente reproducibles y comparables con el método convencional (estático) (Penner y Schmidt, 2013; Schmidt y Lee, 2011). Además, el método DDI tiene la ventaja de ser rápido, menos laborioso, requiere pocas cantidades de muestra y da mayor número de puntos de la isoterma.

## 10. Modelado matemático de las isotermas de adsorción

Se evaluó el ajuste de las isotermas de adsorción a los siguientes modelos matemáticos:

- *Modelo de Guggenheim, Anderson and de Boer (GAB)*

$$x = \frac{x_m c k a_w}{(1 - k a_w)(1 - k a_w + c k a_w)} \quad \text{Ec. 2.2}$$

- *Modelo de Oswin*

$$x = \left( \frac{-A_O}{((1/a_w) - 1)^{B_O}} \right) \quad \text{Ec. 2.3}$$

- *Modelo de Halsey*

$$x = \left( \frac{-A_H}{\ln(a_w)} \right)^{1/B_H} \quad \text{Ec. 2.4}$$

- *Modelo de Iglesias y Chirife*

$$x = A_I + B_I \left( \frac{a_w}{1 - a_w} \right) \quad \text{Ec. 2.5.}$$

donde  $x$  es el contenido de humedad en base seca;  $a_w$  la actividad acuosa;  $x_m$  es el contenido de humedad de la monocapa;  $c$ ,  $k$ ,  $A_O$ ,  $B_O$ ,  $A_H$ ,  $B_H$ ,  $A_I$  y  $B_I$  son los parámetros de ajuste correspondientes a cada modelo (Iglesias y Chirife, 1995).

Los parámetros de las ecuaciones fueron calculados mediante regresión no lineal usando el paquete estadístico OriginPro 8 (Origin Lab Inc. EE.UU.) El nivel de ajuste de cada modelo a los datos experimentales fue evaluado mediante el valor del  $R^2$  ajustado, el error cuadrático medio ( $R_{MSE}$ ) y la distribución de residuos.

## 11. Análisis estadístico

A lo largo de este trabajo de tesis el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SYSTAT Inc. (Evanston, EE.UU.). Se realizaron análisis de varianza (ANAVA) y test de comparación de medias (Test de Tukey, Test de Fisher LSD), con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ).

## Resultados y discusión

### 1. Contenido de materia seca, concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante

Los extractos de yerba mate mostraron un aumento significativo en el contenido de materia seca y de polifenoles totales, proporcional a la cantidad de materia prima empleada en la preparación (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Contenido de materia seca y concentración de polifenoles totales del extracto de yerba mate

Cantidad de yerba mate empleada en la preparación (g/100 mL de agua)	Contenido de materia seca (g/100 mL de extracto)	Concentración de polifenoles totales (mg AC/mL de extracto)
3	$1.5 \pm 0.7^a$	$2.3 \pm 0.2^a$
5	$3.3 \pm 0.5^b$	$5.6 \pm 0.8^b$
10	$3.8 \pm 0.8^c$	$10.5 \pm 1.2^c$

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, se encontró una correlación lineal entre el contenido de polifenoles totales y su actividad inhibitoria frente al radical DPPH, a concentraciones de polifenoles menores de 0.2 mg AC/mL de extracto (Fig. 2.4). Por encima de este valor se alcanzó una meseta en la que la actividad antiradicalaria resultó independiente de la concentración de compuestos fenólicos obteniéndose %I de alrededor del 90%.

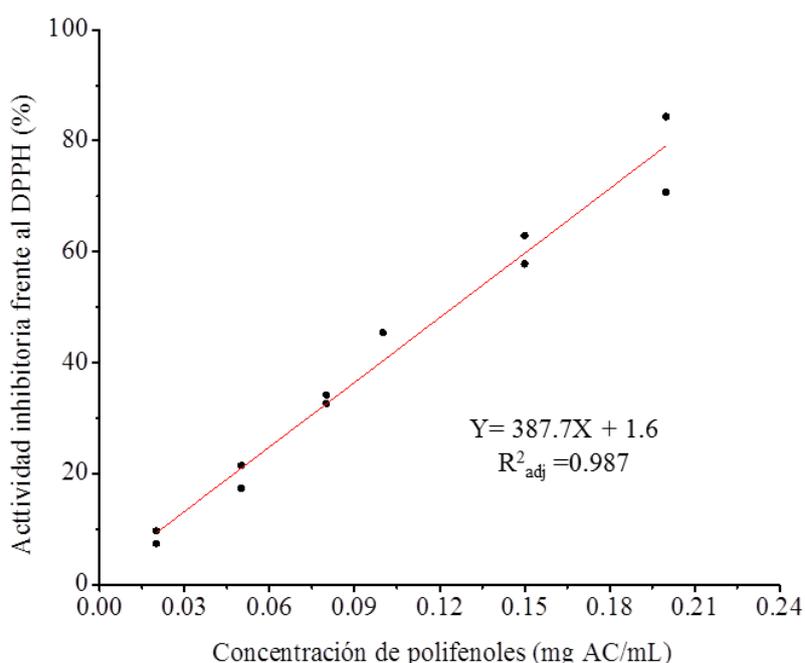


Figura 2.4. Actividad inhibitoria frente al radical DPPH del extracto acuoso de yerba mate en función de su concentración de polifenoles totales.

A partir de la Fig. 2.4 se extrapola la concentración de polifenoles necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial del radical DPPH•, conocida como concentración eficiente,  $EC_{50}$  (Brand-Williams y col., 1995). Este parámetro es utilizado comúnmente para la comparación de distintos antioxidantes. Cuanto menor es su valor, mayor es la capacidad antioxidante de la sustancia bajo estudio. El extracto acuoso de yerba mate mostró un valor de  $EC_{50}$  de alrededor de 0.12 mg de AC/mL característico de una elevada actividad antioxidante. Valores de  $EC_{50}$  de 0.11, 0.07 y 0.04 mg/mL han sido informados para soluciones estándares de ácido clorogénico, ácido ascórbico y BHT, respectivamente (Xiang y Ning, 2008).

Con respecto a la actividad reductora de iones férricos del extracto de yerba mate, ésta se incrementó en forma lineal para concentraciones de polifenoles totales entre 0.02 y 0.14 mg AC/mL (Fig. 2.5).

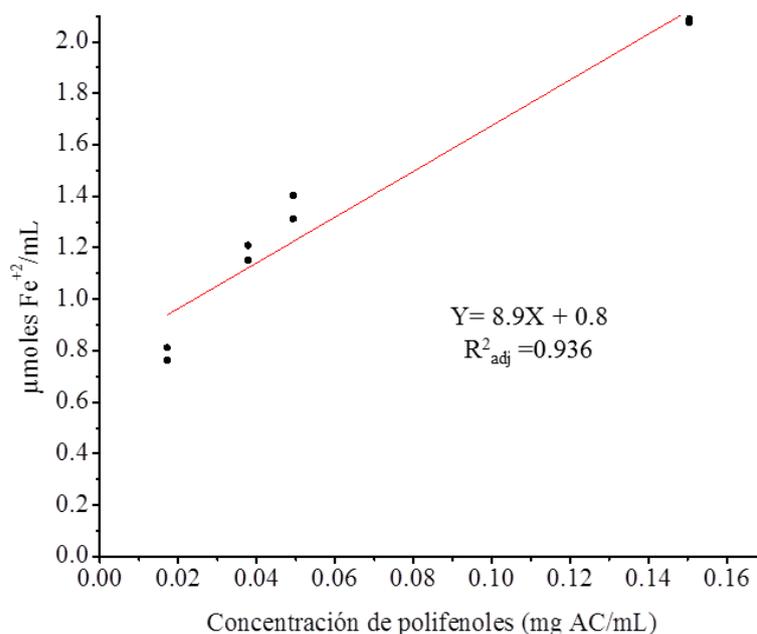


Figura 2.5. Actividad reductora de iones férricos del extracto de yerba mate en función de su concentración de polifenoles totales.

La efectividad de los extractos de yerba mate como antioxidantes ha sido atribuida principalmente a su alto contenido de ácido clorogénico y sus derivados, ácido cafeico y rutina (Filip, y col., 2000; Heck, y col., 2007; Jaiswal, y col., 2010). Según Marques y Farah (2009) y Brewer (2011) estos compuestos pueden actuar mediante dos mecanismos principales: i) quelando iones metálicos, o, ii) cediendo un radical hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, dada la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático.

## 2. Perfil cuali-cuantitativo del extracto de yerba mate obtenido por HPLC

La Fig. 2.6 muestra el cromatograma del extracto acuoso de yerba mate. Se obtuvieron picos a distintos tiempos de retención ( $t_r$ ) correspondientes al ácido clorogénico ( $t_r = 12$  min), ácido cafeico ( $t_r = 15$  min), rutina ( $t_r = 37$  min) y cafeína ( $t_r = 25$  min). Además se detectaron otros compuestos (picos 1, 2, 6 y 8) cuyos espectros DAD mostraron alta coincidencia con el del ácido clorogénico. Estos fueron considerados como "compuestos relacionados con el ácido clorogénico" y su concentración fue calculada como la suma de las áreas de los picos 1, 2, 6 y 8 y expresada como mg equivalentes de ácido clorogénico.

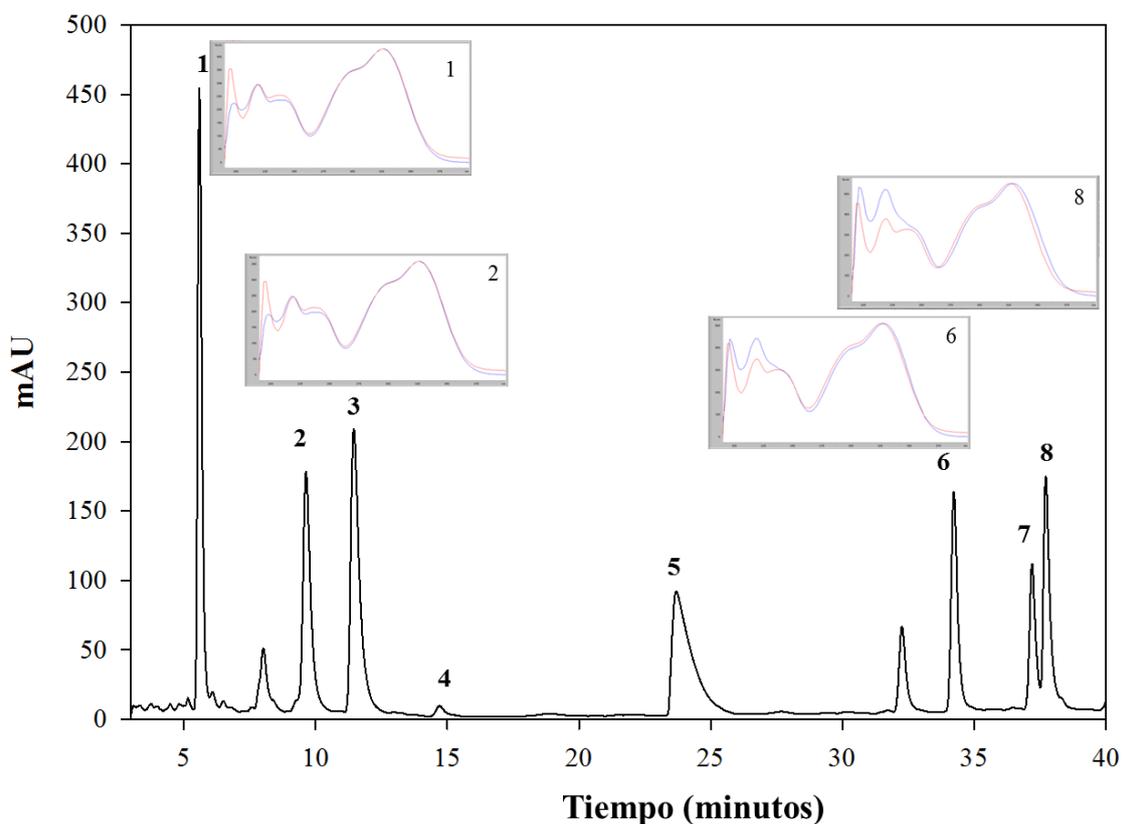


Figura 2.6. Cromatograma HPLC del extracto acuoso de yerba mate ( $\lambda=270$  nm). Pico 3: ácido clorogénico; 4: ácido cafeico; 5: cafeína y 7: rutina. Picos 1, 2, 6 y 8 compuestos no identificados. Los recuadros muestran los espectros DAD del ácido clorogénico (línea roja) y los compuestos no identificados (línea azul).

En la Tabla 2.2 se muestran las concentraciones de compuestos fenólicos y de cafeína presentes en el extracto acuoso de yerba mate. Resultados similares fueron obtenidos por Anesini y col. (2012) empleando un extracto acuoso de yerba mate comercial (ácido clorogénico: 20.7 mg/g; ácido cafeico: 0.33 mg/g; rutina: 12.8 mg/g y cafeína: 13.5 mg/g).

Tabla 2.2. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína presentes en el extracto acuoso de yerba mate

Polifenoles <sup>a</sup> totales	AC <sup>b</sup>	Derivados del AC <sup>b</sup>	Ác. cafeico <sup>b</sup>	Rutina <sup>b</sup>	Cafeína <sup>b</sup>
105.2	21.2	65.2	0.41	8.3	17.4

<sup>a</sup> expresado como mg de AC/g de yerba mate; <sup>b</sup> mg de compuesto/ g yerba mate

### 3. Identificación de los principales grupos funcionales presentes en el extracto de yerba mate mediante FTIR

El espectro IR del extracto de yerba mate se muestra en la Fig. 2.7. Considerando que cada banda corresponde a un movimiento de vibración de un enlace determinado de una molécula, el conjunto de señales presentadas en el espectro constituye la “huella dactilar” de este extracto. Se observó una banda ancha alrededor de  $3380\text{ cm}^{-1}$  asignada al estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$ . Las señales detectadas a  $1630$  y  $1520\text{ cm}^{-1}$  fueron atribuidas a la vibración del anillo aromático ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) de compuestos fenólicos.

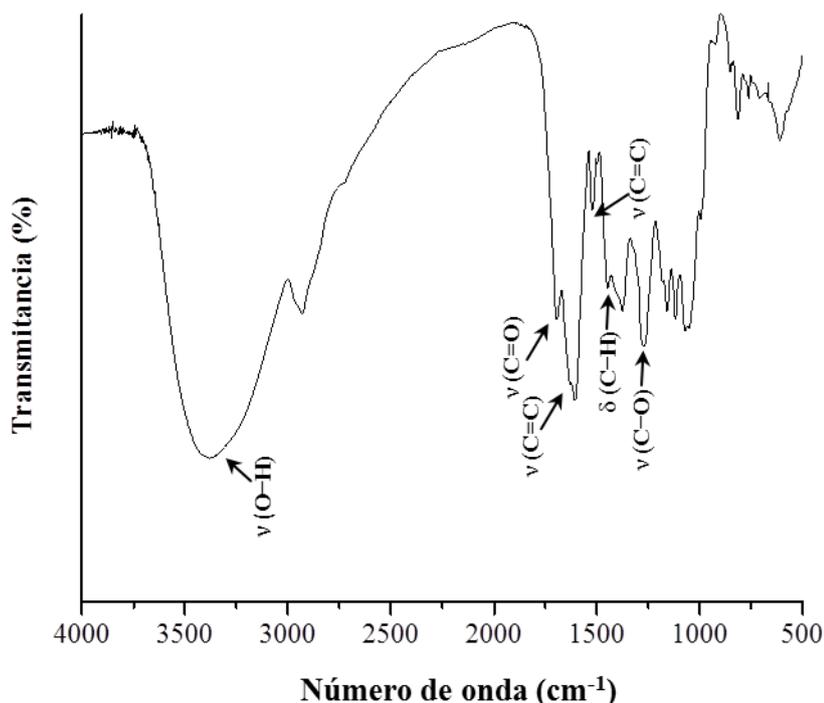


Figura 2.7. Espectro de infrarrojo del extracto seco de yerba mate.

Las bandas localizadas a  $1690$  y  $1270\text{ cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento de los grupos  $\text{C}=\text{O}$ . Señales similares fueron detectadas por Liang y col. (2011) y Moç y col. (2011) en los espectros IR de extractos de té verde y propóleos, respectivamente.

#### 4. Patrón de difracción de rayos X y temperatura de transición vítrea del extracto seco de yerba mate

La Fig. 2.8 muestra el patrón de difracción de rayos X obtenido para el extracto seco de yerba mate. Se observaron picos no definidos con ruido abundante característicos de estructuras amorfas. Resultados similares fueron encontrados por Gallo y col. (2013) y Fernandes y col. (2013) trabajando con extractos obtenidos mediante secado por atomización de *Hamamelis virginiana* y *Schinopsis brasiliensis Engl*, respectivamente.

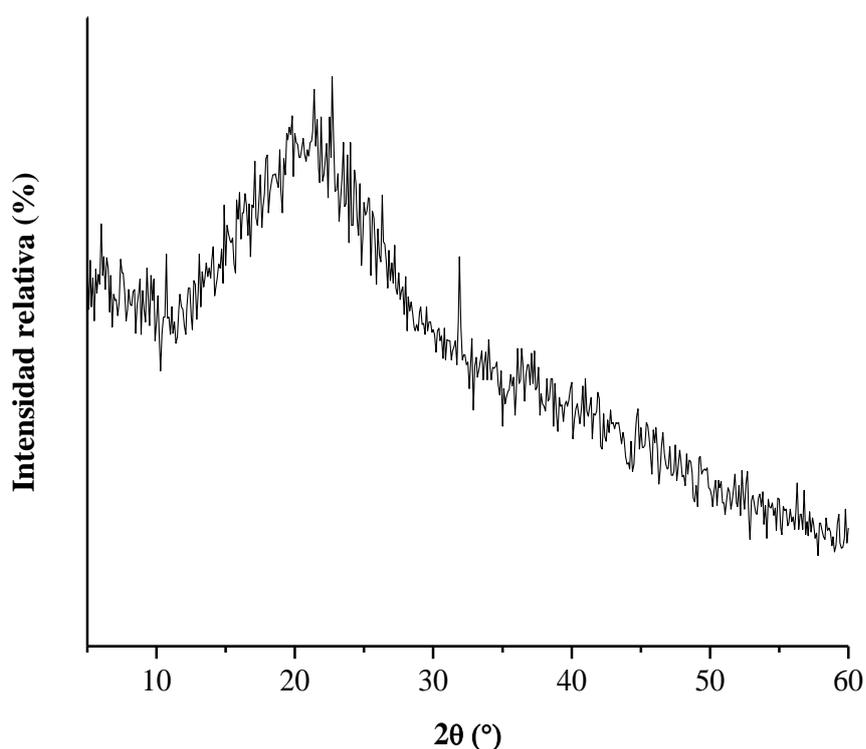


Figura 2.8. Patrón de difracción de rayos X del extracto seco de yerba mate.

Los termogramas obtenidos mediante DSC de los extractos secos de yerba mate se muestran en la Fig. 2.9. Se observó una temperatura de transición vítrea alrededor de los 45°C, por lo que estos extractos se encuentran en estado vítreo a temperatura ambiente (20°C), con una movilidad molecular reducida. De acuerdo a Bhandari y Howes (1999), en dicho estado los materiales mantienen sus propiedades fisicoquímicas y disminuye la ocurrencia de reacciones de deterioro. Sin embargo, el estado vítreo es considerado metaestable y puede ser alterado por efecto del contenido de humedad y la temperatura.

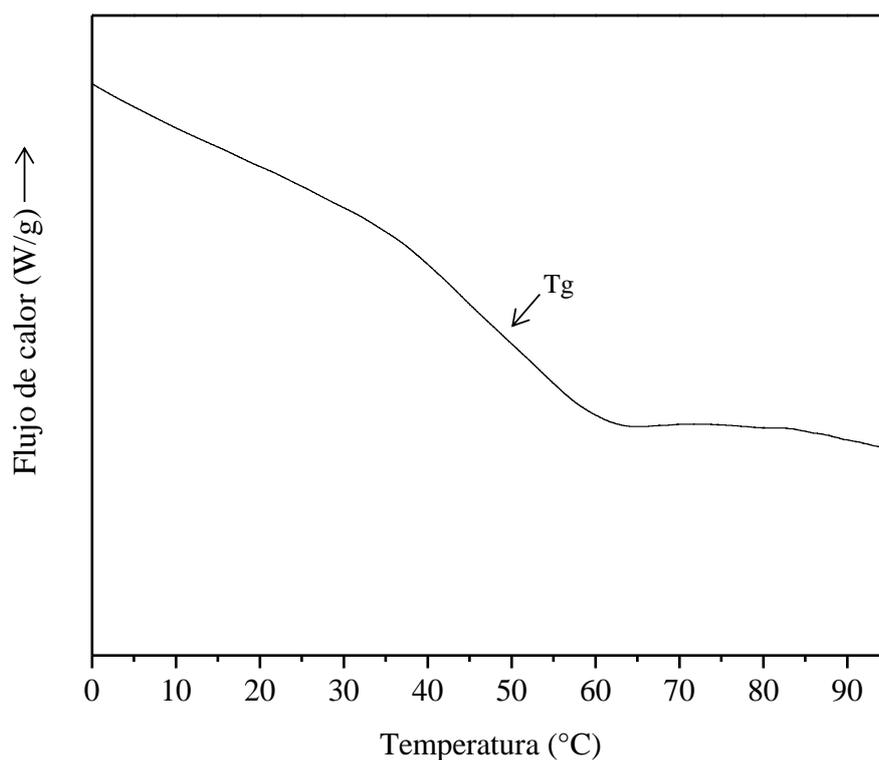


Figura 2.9. Temperatura de transición vítrea (Tg) del extracto seco de yerba mate.

En productos altamente higroscópicos, a medida que el material adsorbe humedad del ambiente, la Tg disminuye incrementando a su vez su movilidad molecular y favoreciendo las reacciones de degradación. Este comportamiento ha sido observado para diferentes extractos de plantas obtenidos por secado por atomización o liofilización (Fang y Bhandari, 2011).

### 5. Isotermas de adsorción del extracto seco de yerba mate

Las isotermas de sorción de vapor de agua constituyen una herramienta útil para evaluar la estabilidad de productos frente a diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura. En la Fig. 2.10 se muestra las isotermas de adsorción del extracto seco de yerba mate. Estos productos mostraron baja adsorción de vapor de agua a humedades relativas (HR) menores a 70%. A valores superiores de HR, el extracto seco mostró una elevada ganancia de agua alcanzando contenidos de humedad en base seca de alrededor del 58%. Este comportamiento puede ser atribuido al alto contenido de grupos hidroxilos de las moléculas presentes en el extracto (principalmente de ácidos fenólicos y flavonoides), como fue detectado mediante FTIR (Fig. 2.7).

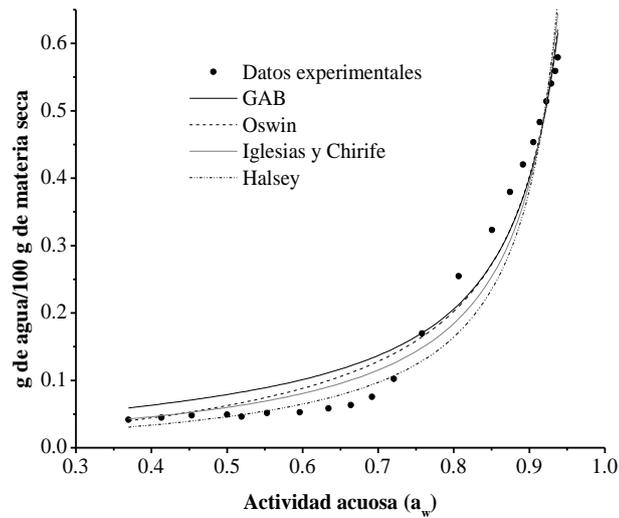


Figura 2.10. Isotherma de adsorción del extracto seco de yerba mate.

El mecanismo de adsorción de agua sobre biomateriales ha sido ampliamente estudiado por varios autores encontrando que éste se encuentra directamente relacionado con la habilidad del material de formar puentes de hidrógeno. Tonon y col. (2009) y Comunian y col. (2011) encontraron que en extractos naturales en polvo la capacidad de adsorber agua del ambiente se incrementa al aumentar la presencia de regiones amorfas.

Brunauer y col. (1940) agruparon los comportamientos típicos de isothermas de sorción de distintos materiales en cinco categorías (Fig. 2.11). Las isothermas más comunes en alimentos son las tipo 2 y 4 (Mathlouthi y Rogé, 2003).

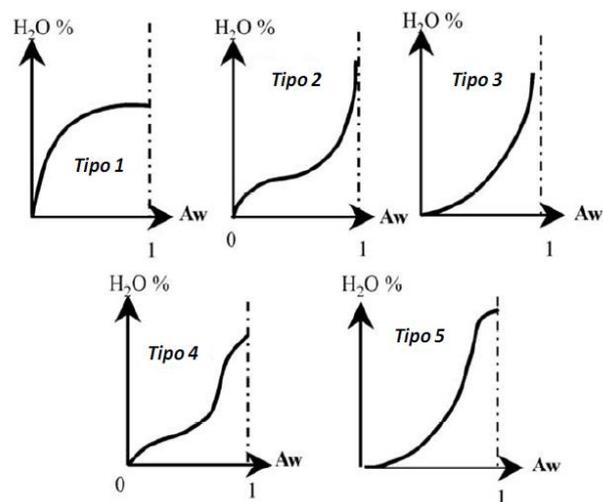


Figura 2.11. Clasificación del comportamiento de isothermas de sorción, según Brunauer y col. (1940).

El extracto seco mostró una isoterma de adsorción tipo 2 (sigmoidea), característica de materiales con baja adsorción de agua a bajas actividades acuosas, que luego incrementan su contenido de humedad, mostrando una tendencia asintótica a medida que aumenta la actividad acuosa. Un comportamiento similar fue observado por Sinija y Mishra (2008) y Argyropoulos y col. (2012) para polvos solubles de té verde y hojas secas de limón, respectivamente. Este último grupo de autores empleó un analizador de sorción dinámico (DVS, en inglés “Dynamic Vapor Sorption”) similar al usado en este estudio.

En la Tabla 2.3 se muestran los parámetros de los modelos matemáticos obtenidos para las isotermas de adsorción del extracto seco de yerba mate. Todas las ecuaciones empleadas mostraron un ajuste satisfactorio a los datos experimentales, presentando valores de  $R^2_{adj} > 0.9$  y de  $R_{MSE}$  de alrededor de 0.04.

Tabla 2.3. Parámetros de los modelos matemáticos ajustados para la isoterma de sorción del extracto seco de yerba mate

<i>Modelo de GAB</i>				
$x_m$	c	k	$R^2_{adj}$	$R_{MSE}$
0.044	10.421	0.991	0.963	0.040
<i>Modelo de Oswin</i>				
$A_O$	$B_O$		$R^2_{adj}$	$R_{MSE}$
0.062	0.848		0.972	0.035
<i>Modelo de Halsey</i>				
$A_H$	$B_H$		$R^2_{adj}$	$R_{MSE}$
0.044	0.890		0.949	0.047
<i>Modelo de Iglesias y Chirife</i>				
$A_I$	$B_I$		$R^2_{adj}$	$R_{MSE}$
0.018	0.041		0.964	0.040

$x_m$ , contenido de humedad de la monocapa; c, k,  $A_O$ ,  $B_O$ ,  $A_H$ ,  $B_H$ ,  $A_I$  y  $B_I$  son los parámetros de ajuste correspondientes a cada modelo.

A partir del modelo de GAB, se obtuvieron contenidos de humedad en la monocapa ( $x_m$ ) de alrededor de 0.044 kg de agua/kg de materia seca. El valor de  $x_m$  indica la cantidad de agua fuertemente adsorbida sobre una región específica del material y constituye un parámetro importante para evaluar su estabilidad (Pérez-Alonso y col., 2006). En alimentos comúnmente se informan valores de  $x_m$  entre 0.03 y 0.2 kg de agua/kg de materia seca (Fu y Labuza, 1993; Vega-Gálvez y col., 2007). De acuerdo a Fu y Labuza (1993), los alimentos con valores de  $x_m$  menores a 0.1, como es el caso del extracto de yerba mate, pueden ser considerados estables.



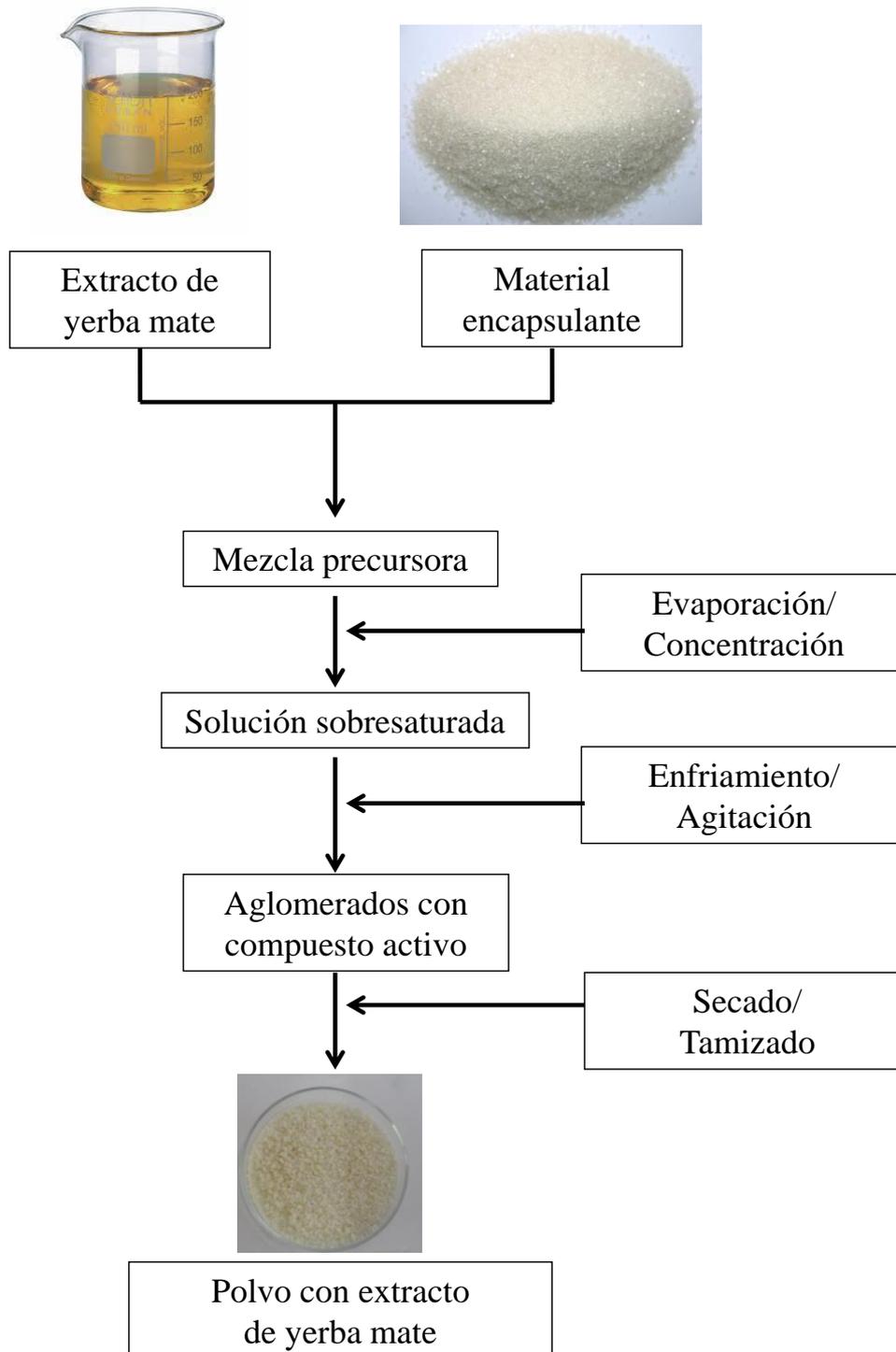


Figura 2.13. Proceso de obtención de antioxidantes de yerba mate encapsulados mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.

Se prepararon distintas formulaciones (Tabla 2.4) tomando como referencia las concentraciones de ingredientes empleadas por otros autores (Beristain y col., 1996; Bhandari y Hartel, 2002).

Tabla 2.4. Formulaciones usadas para obtención de los polvos con antioxidantes de yerba mate mediante co-cristalización

Ingrediente	Control	F1	F2	F3	F4
Sacarosa (g)	100	100	100	100	100
Glucosa (g)	-	-	10	15	20
Extracto acuoso de yerba mate (mL)	-	20	20	20	20
Agua destilada (mL)	20	-	-	-	-

Las mezclas fueron calentadas a dos temperaturas distintas (80°C y 132°C), usando una placa calefactora (IKA RH1, Alemania). Esta etapa se realizó bajo agitación constante a 500 rpm, empleando un agitador vertical con paleta tipo ancla (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). Además, se monitoreó la temperatura de la mezcla empleando una sonda (Testo, Argentina) y la concentración de sólidos solubles usando un refractómetro digital (Hanna Instruments, EE.UU.). Una vez alcanzada la temperatura final, las mezclas se mantuvieron a las mismas condiciones hasta alcanzar la sobresaturación. Luego se retiraron de la placa calefactora y se enfriaron a temperatura ambiente bajo agitación a 700 rpm. Los productos obtenidos se sometieron a secado a 40°C en una estufa de convección forzada (SanJor, Argentina) hasta peso constante y luego fueron molidos con un mortero de porcelana. Finalmente, los polvos se colocaron en bolsas plásticas y se almacenaron en desecadores con sílica gel hasta su análisis.

Para analizar el efecto del tamaño de partícula sobre la fluidez, el tiempo de disolución en agua, la higroscopicidad y la estabilidad química durante el almacenamiento, los polvos se separaron en dos fracciones: partículas de 1 a 2 mm de diámetro y partículas de 0.5 a 1 mm de diámetro.

## 2. Efecto del proceso de co-cristalización sobre los agentes encapsulantes

Para evaluar si durante el proceso de calentamiento ocurren cambios en la concentración de los agentes encapsulantes, se determinó la concentración de sacarosa y glucosa en productos aglomerados sin compuesto activo y los resultados se compararon con la cantidad inicial de cada material adicionada a las mezclas precursoras. La concentración de glucosa fue analizada mediante un kit enzimático secuencial de glucosa-oxidasa y peroxidasa. Este método se fundamenta en la oxidación de la glucosa en presencia de glucosa-oxidasa (GOD). En esta reacción se forman peróxidos, los cuales reaccionan con

4-aminofenazona (4-AF) en presencia de peroxidasa (POD) produciendo compuestos coloreados (Fig. 2.14).

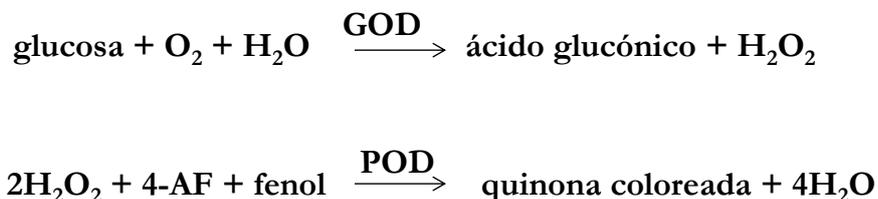


Figura. 2.14. Fundamento del método enzimático secuencial GOD-POD para la determinación de glucosa.

Se disolvió una cantidad conocida de muestra en un volumen de agua destilada. Se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de solución y se llevaron a tubos de ensayo conteniendo 2 mL de la mezcla de reacción (Wiener Lab., Argentina). Estos se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Luego se procedió a la medida de absorbancia a 505 nm empleando un espectrofotómetro. La calibración del método se realizó utilizando glucosa anhidra (Anedra, Argentina) como estándar.

Para la determinación del contenido de sacarosa, las muestras fueron hidrolizadas a glucosa y fructosa, empleando  $\beta$ -fructosidasa (Megazyme, Irlanda). Luego se determinó la concentración de glucosa como se describió anteriormente.

### **3. Efecto del proceso de co-cristalización sobre los compuestos activos**

#### *3.1. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación*

La capacidad de carga de compuestos activos ( $L_c$ ) se determinó disolviendo 1 g de polvo con extracto de yerba mate en 10 mL de agua destilada. A esta mezcla se le determinó el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Los resultados fueron expresados como mg de ácido clorogénico (AC)/ g polvo.

La eficiencia de encapsulación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% EE = \left( \frac{L_c}{L_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde  $L_0$  corresponde a la masa de polifenoles totales presente en el extracto de yerba mate empleado en la formulación de los polvos.

### *3.2. Actividad antioxidante de los extractos de yerba mate encapsulados*

Se disolvió 1 g de polvo con extracto de yerba mate en 10 mL de agua destilada. Una alícuota de 100  $\mu$ L se mezcló con 3.9 mL de solución etanólica (25 mg /L) de DPPH• (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Luego de un tiempo de reacción de 30 min se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm. La actividad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH (Brand-Williams y col., 1995).

## **4. Contenido de humedad y actividad acuosa**

El contenido de humedad (%) fue determinado por el método gravimétrico, secando en estufa de vacío a 70°C hasta peso constante (AOAC, 1998). La medición de actividad acuosa se realizó a 25°C en un equipo Aqualab Serie 3 TE (Decagon, Inc. EE.UU.) (AOAC, 1998).

## **5. Calorimetría diferencial de barrido**

El estudio de la estabilidad térmica de los extractos de yerba mate encapsulados se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, EE.UU.). Las muestras (3-5 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente. Estas se calentaron a una velocidad de 10°C/min, entre 50 y 220°C.

## **6. Microscopía electrónica de barrido**

El análisis morfológico de los polvos con extracto de yerba mate se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), empleando un equipo FEI-Quanta 200 (Holanda). Las muestras se adhirieron con una cinta de doble faz sobre los porta-muestras cilíndricos, se metalizaron con una capa de oro y se examinaron empleando un voltaje de aceleración de 20 kV.

## 7. Análisis de color

El color de los materiales en polvo fue medido en el espacio CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) empleando un colorímetro tri-estímulo Minolta (Konica-Minolta CR-400, Japón). En esta escala  $L^*$  corresponde a la luminosidad, tomando valores entre 0 (negro) y 100 (blanco), el parámetro  $a^*$  representa las tonalidades que van desde el verde (valores negativos) al rojo (valores positivos) y el parámetro  $b^*$  corresponde a los tonos que van desde el azul (valores negativos) hasta el amarillo (valores positivos). Los parámetros croma y ángulo Hue fueron calculados mediante las ecuaciones 2.7 y 2.8, respectivamente.

$$\text{Croma} = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad \text{Ec. 2.7}$$

$$\text{Ángulo Hue} = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Ec. 2.8}$$

## 8. Tiempo de disolución en agua

Se midió el tiempo que tarda en disolverse 1 g de extracto de yerba mate encapsulado en 10 mL de agua destilada a 25°C, bajo agitación constante (agitador magnético IKA RH1, Alemania). Se tomaron alícuotas de la mezcla a diferentes tiempos y se determinó la masa de sacarosa disuelta en la solución usando un refractómetro digital.

## 9. Propiedades de flujo

La fluidez de los polvos fue evaluada de acuerdo a lo sugerido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007):

### 9.1. *Ángulo de reposo dinámico*

Se empleó una cámara cilíndrica rotativa (Banco para el estudio del manejo de sólidos, Armfield, Reino Unido). Esta cámara se inclina gradualmente hasta que el polvo se desliza y se registra el ángulo formado entre la horizontal y la superficie libre del material (Fig. 2.15).

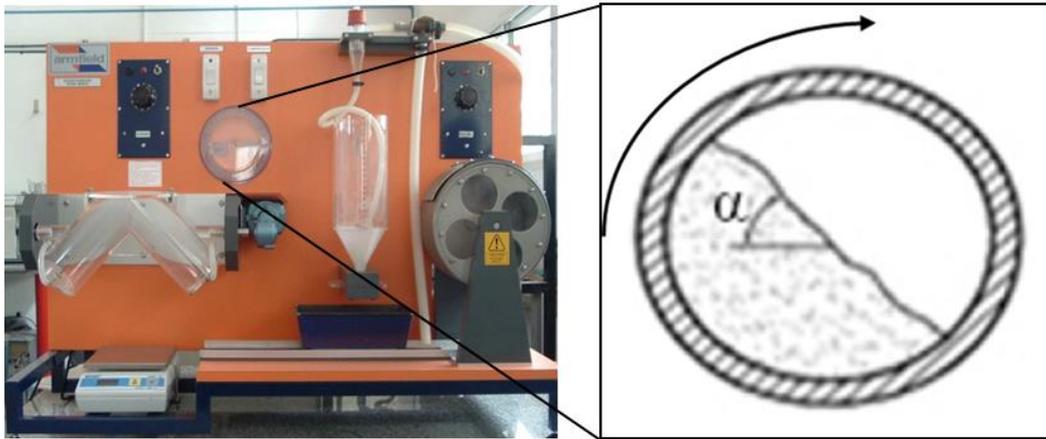


Figura 2.15. Cámara cilíndrica rotativa para medición de ángulo de reposo dinámico del banco para el estudio del manejo de sólidos.

En los ensayos se colocó la muestra en el embudo y se transfirió a la cámara de ángulo de reposo hasta completar la mitad de su capacidad, nivelándose la superficie. Luego se rotó el dispositivo hasta que las partículas comenzaron a deslizarse, momento en el cual se registró la lectura. Finalmente, se rotó la cámara en la dirección opuesta hasta que las partículas comenzaron a deslizarse en el sentido contrario y se registró una segunda lectura. El promedio de las dos lecturas representa el ángulo de reposo del sólido. Los ensayos se realizaron por quintuplicado.

### 9.2. Índices de Hausner y Carr

Los índices de Hausner (IH) y de Carr (IC) fueron calculados empleando las siguientes ecuaciones:

$$IH = \frac{\rho_c}{\rho_a} \quad \text{Ec. 2.9}$$

$$IC(\%) = \frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \times 100 \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde  $\rho_c$  corresponde a la densidad compactada y  $\rho_a$  a la densidad aparente. Ambos parámetros fueron determinados dejando caer libremente una masa conocida de producto dentro de una probeta graduada. El valor de  $\rho_a$  se calculó como el cociente entre la masa de producto y el volumen ocupado por el mismo en la probeta.

El cálculo de  $\rho_c$  se realizó como el cociente de la masa de polvo y el volumen ocupado por el producto después de golpear la probeta contra una superficie plana hasta alcanzar un volumen constante.

## **10. Identificación de principales grupos funcionales mediante FTIR**

Las muestras fueron mezcladas con bromuro de potasio y molidas cuidadosamente con mortero de ágata. Los espectros fueron tomados en el modo de transmisión entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , adquiriendo 64 escaneos en promedio con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . El análisis espectral se realizó empleando el software Omnic versión 8.1.

## **11. Isotermas de adsorción**

Se empleó el método de isoterma con punto de rocío dinámico. Las muestras (1-2 g) se analizaron en un analizador de sorción de vapor VSA 1020 operando a 20°C. Se evaluó el ajuste de las isotermas de adsorción de los polvos a los modelos de GAB, Iglesias y Chirife, Halsey, y Oswin (Iglesias y Chirife, 1995).

## **12. Estabilidad del extracto de yerba mate encapsulado durante el almacenamiento**

Se introdujeron cajas de Petri conteniendo 2 g de polvo con extracto de yerba mate en frascos de vidrio herméticos, previamente acondicionados con soluciones sobresaturadas de cloruro de sodio a una humedad relativa (HR) del 75% (Fennema y Tannenbaum, 1996). Los recipientes fueron llevados a una cámara de temperatura controlada a 20°C.

### *12.1. Cinética de ganancia de agua e higroscopicidad*

Se determinó la masa de los productos a diferentes tiempos hasta que alcanzaron un peso constante. El contenido de humedad en base seca se calculó mediante la siguiente ecuación (Jaya y Das, 2004):

$$W(\%) = \left( \frac{b + H}{a - H} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.11}$$

donde b (g) es el aumento de masa del polvo, a (g) es la masa inicial de la muestra y H es la humedad inicial de la muestra.

La higroscopicidad (HG%) fue expresada como la masa de agua adsorbida en el equilibrio por cada 100 gramos de muestra seca (Newman y col., 2008).

### 12.2. Estabilidad química del extracto de yerba mate encapsulado

Se tomaron muestras de polvo con extracto de yerba mate a diferentes tiempos y se les determinó el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante frente al radical DPPH, como se describió anteriormente. Además, se la concentración de compuestos fenólicos y de cafeína presente en los productos, antes y después del almacenamiento, mediante HPLC.

### 12.3. Cristalinidad y análisis morfológico

Se tomaron muestras de los polvos al final del almacenamiento y se les analizó el patrón de difracción de rayos X y la morfología mediante microscopía SEM.

## 13. Aplicación de los polvos con antioxidantes de yerba mate en la formulación de una bebida refrescante

Se preparó una bebida conteniendo polvo con extracto de yerba mate, agua, esencia de limón (Saporiti, Argentina) y ácido cítrico (Parafarm, Argentina) (Tabla 2.5). Este último es considerado GRAS por la FDA y es empleado comúnmente en la industria alimentaria como acidulante, conservante, quelante, inhibidor de pardeamiento enzimático, entre otros. Además tiene la ventaja de ser altamente soluble en agua, abundante y de bajo costo (Roehr y col., 2008). Como fórmula control, se preparó una mezcla empleando sacarosa comercial, en lugar de polvo con extracto. La relación óptima de azúcar y ácido cítrico empleada en las formulaciones fue seleccionada en ensayos preliminares y considerando las concentraciones de estos ingredientes empleadas por otros autores (McBride y Johnson, 1987). Los ingredientes en polvo fueron pesados y homogenizados y luego la mezcla fue disuelta en agua potable fría.

Tabla 2.5. Formulaciones de bebidas refrescantes con y sin extracto antioxidante de yerba mate en polvo.

Formulación	Sacarosa comercial (g/L)	Polvo con antioxidantes de yerba mate (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Esencia de limón (g/L)
Control	100	-	5	0.2
Con antioxidantes	-	100	5	0.2

La prueba de aceptabilidad sensorial de las bebidas fue realizada por un panel de 40 jueces no entrenados. La cantidad de evaluadores necesaria para el ensayo fue seleccionada teniendo en cuenta lo recomendado por Hough y col. (2006). Las muestras fueron servidas en vasos de poliestireno y fueron presentadas a los evaluadores en orden aleatorio codificadas con números de 3 dígitos. Se proporcionó agua potable para el enjuague de la boca entre muestras. Se evaluaron los atributos de aceptabilidad global, color, sabor y dulzor mediante una escala hedónica de 1 a 9 puntos (1 = “me disgusta mucho”; 5= ni me gusta, ni me disgusta; 9 =“me gusta mucho”) (Fig. 2.16).

La comparación entre los niveles de aceptabilidad de las muestras fue realizada empleando un test de Student para ensayos de dos colas. Los valores de t-Student experimental ( $t_{\text{exp}}$ ) fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$t_{\text{exp}} = \frac{d}{S_d / \sqrt{N}} \quad \text{Ec. 2.12}$$

donde  $d$  es la diferencia promedio,  $S_d$  es la desviación estándar de las diferencias y  $N$  el número de evaluadores. Los valores de  $d$  y  $S_d$  fueron calculados con las siguientes ecuaciones:

$$d = \frac{\sum d_i}{N} \quad \text{Ec. 2.13}$$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - d)^2}{N - 1}} \quad \text{Ec. 2.14}$$

donde  $d_i$  corresponde a la diferencia ente las muestras evaluadas por cada consumidor.

**PRUEBA DE ACEPTABILIDAD DE BEBIDA TIPO LIMONADA**

Nombre: ..... Consumidor No.....

Por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo marcando con una cruz (X) el cuadrado que mejor represente su opinión. Analice primero la muestra que se le presenta al lado izquierdo y luego la de su lado derecho.

<b>Muestra No. _____</b>	<b>Me disgusta mucho</b>			<b>Me es indiferente</b>			<b>Me gusta Mucho</b>		
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>								
Color	<input type="checkbox"/>								
Sabor	<input type="checkbox"/>								
Dulzor	<input type="checkbox"/>								

<b>Muestra No. _____</b>	<b>Me disgusta mucho</b>			<b>Me es indiferente</b>			<b>Me gusta Mucho</b>		
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>								
Color	<input type="checkbox"/>								
Sabor	<input type="checkbox"/>								
Dulzor	<input type="checkbox"/>								

**Observaciones:**

.....

Figura 2.16. Planilla utilizada en la prueba de aceptabilidad por atributos de las bebidas refrescantes.

## Resultados y discusión

### 1. Optimización de las variables del proceso de co-cristalización

Se analizó la influencia de la temperatura sobre la velocidad de calentamiento de las mezclas precursoras (Control, F1, F2, F3 y F4). Todas las formulaciones mostraron velocidades de calentamiento de 2-4°C/min a la temperatura de 80°C y de 4-6°C/min a la temperatura 132°C. Lo anterior indica que la presencia de extracto de yerba mate y glucosa no tuvo efectos significativos sobre este parámetro de proceso.

En la Fig. 2.17 se muestran los límites de solubilidad y de la zona metaestable encontrados en literatura, para mezclas de sacarosa y agua (Hartel y Shastry, 1991). Varios autores han informado que el cociente de sobresaturación constituye un factor determinante para establecer las condiciones en las que la cristalización de la sacarosa ocurre espontáneamente y también los posibles mecanismos de nucleación (Beristain y col., 1996; Hartel y col., 2011).

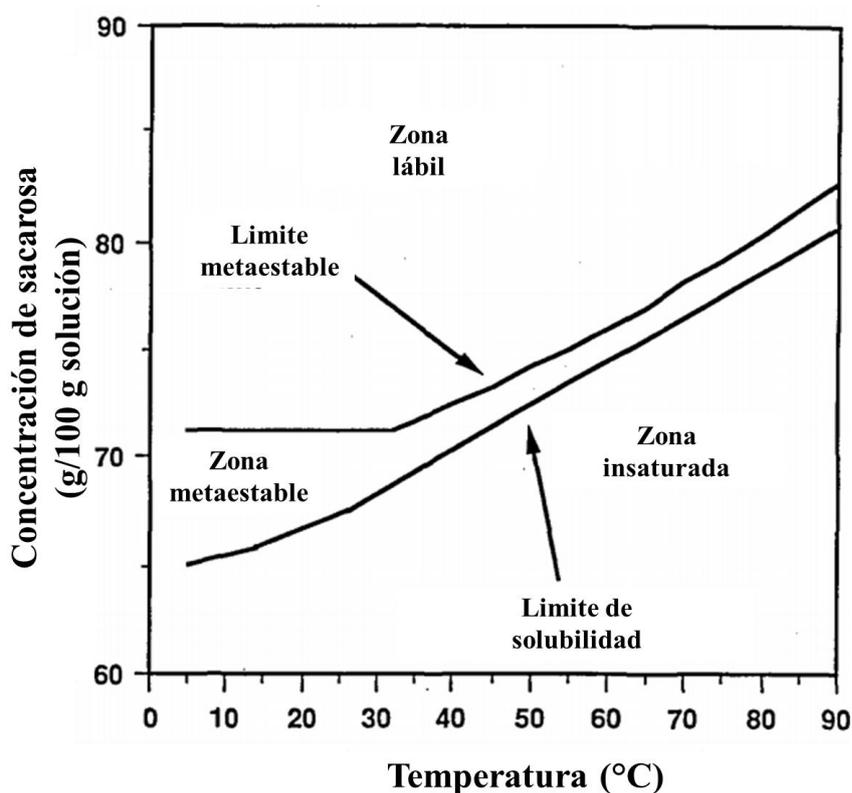


Figura 2.17. Límites de solubilidad y de la zona metaestable de mezclas de sacarosa y agua. Fuente: Hartel y Shastry (1991).

Los cocientes de sobresaturación (S) de las mezclas, alcanzados a las distintas temperaturas, fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$S = \frac{C}{C_o} \quad \text{Ec. 2.15}$$

donde C es la concentración de sacarosa en la solución y C<sub>o</sub> es la concentración de saturación a la misma temperatura. Valores de S>1 son característicos de soluciones sobresaturadas y valores de S=1 corresponden a la concentración de saturación. Los valores de C fueron determinados empleando un refractómetro digital. La solubilidad de la sacarosa a cada temperatura final (80 y 132°C) se calculó mediante la ecuación 2.16 (Hartel y col., 2011).

$$S = 64.397 + 0.0725 T + 0.0020569 T^2 - 9.035 * 10^{-6} T^3 \quad \text{Ec. 2.16}$$

donde T es la temperatura (°C) y S es la solubilidad de la sacarosa (g/100g).

El tiempo requerido para alcanzar la temperatura de 80°C fue de 15 min, siendo necesario mantener la mezcla alrededor de 7 min a la misma temperatura, hasta que se alcanzó el nivel de sobresaturación necesario (S=1.1) para la formación de producto co-cristalizado. En estos ensayos, se observó que la sacarosa no se disolvió totalmente a lo largo del proceso quedando cristales remanentes que probablemente actuaron como semilla para la nucleación desde la solución sobresaturada.

De acuerdo a Beristain y col. (1996), valores de sobresaturación para mezclas de sacarosa y agua entre 1.0-1.25, correspondientes a la zona metaestable, no se consideran lo suficientemente altos para producir una cristalización espontánea. Por lo que puede producirse el crecimiento de cristales existentes, pero no la formación de nuevos núcleos. Sin embargo, los límites de esta región varían en función de la temperatura, la agitación y la pureza de los materiales. Según Hartel y Shastry (1991), el valor crítico de sobresaturación de la sacarosa puede disminuir considerablemente bajo agitación.

En la condición de 132°C, el tiempo requerido para alcanzar la temperatura final fue de 14 min. En este caso, fue posible la obtención de aglomerados mediante cristalización espontánea, en unos pocos minutos. Este comportamiento fue atribuido a que a dicha temperatura se alcanzan valores de S>1.25, correspondientes a la zona lábil, produciéndose

la formación de núcleos cristalinos espontáneamente y sin ningún control (Beristain y col., 1996; Hartel y Shastry, 1991). En ensayos complementarios realizados a temperatura de 66°C, no fue posible la obtención de productos co-cristalizados, probablemente debido al bajo nivel de sobresaturación alcanzado por la mezclas bajo estas condiciones.

Por otro lado, a la condición de temperatura de 80°C los aglomerados se formaron con altos niveles de humedad remanente. Siendo mayor este efecto en las formulaciones adicionadas de glucosa. De acuerdo a Bhandari y Hartel (2002), este comportamiento es atribuido a la disminución de la velocidad de cristalización de la sacarosa en presencia de glucosa y/o fructosa. Los productos obtenidos con la formulación F1 requirieron un tiempo de secado de 4 h a 40°C para alcanzar valores de contenido de humedad de alrededor de 0.04 ±0.01% y de  $a_w=0.4\pm0.02$ . A fin de alcanzar valores similares, el secado de los productos obtenidos con las formulaciones adicionadas de glucosa (F2, F3 y F4), debió ser realizado en varias etapas: 1) secado a 40°C por 48 h; 2) molido y 3) secado a 40°C por 4 h. En estos productos se observó la formación de costra superficial impidiendo la migración de agua desde el interior.

A la temperatura de 132°C se obtuvieron productos con valores menores de 0.4% de humedad y 0.5 de  $a_w$ , con tiempos de secado menores a 1 h. De acuerdo con Fennema y Tannenbaum (1996) y Fu y Labuza (1993) en productos con  $a_w$  por debajo de 0.6 no ocurre proliferación bacteriana, por lo que éstos pueden ser considerados muy estables en este sentido. En ningún caso, se produjo degradación de los azúcares obteniéndose porcentajes de recuperación de alrededor del 98%.

La incorporación de glucosa no produjo ventajas respecto del uso de sacarosa en forma individual; por esta razón los ensayos posteriores se realizaron empleando la formulación F1, a una temperatura final de proceso de 132°C. Los productos obtenidos a partir de los extractos preparados con 3, 5 y 10 g yerba mate/100 mL, serán referidos como CY3, CY5 y CY10, respectivamente.

## 2. Eficiencia de encapsulación, contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante

Se obtuvieron eficiencias de encapsulación de alrededor del 85% en todos los casos. Deladino y col. (2007), trabajando con extracto de yerba mate liofilizado, obtuvieron rendimientos del 72%. En este caso, el empleo del extracto líquido en lugar de la adición de polvo liofilizado, disminuyó el número de etapas del proceso y mejoró el rendimiento de encapsulación.

La cantidad de polifenoles encapsulada aumentó significativamente a mayor contenido de estos compuestos en el extracto ( $p < 0.05$ ). Se obtuvieron valores de alrededor de 0.5, 1.2 y 1.8 mg AC/g de producto para las muestras CY3, CY5 y CY10, respectivamente. Este comportamiento constituye una ventaja para controlar la dosis de antioxidante requerida en una formulación específica. Una tendencia similar fue observada para la actividad inhibitoria frente al radical DPPH, la cual se incrementó significativamente a mayor contenido de polifenoles encapsulados ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2.18).

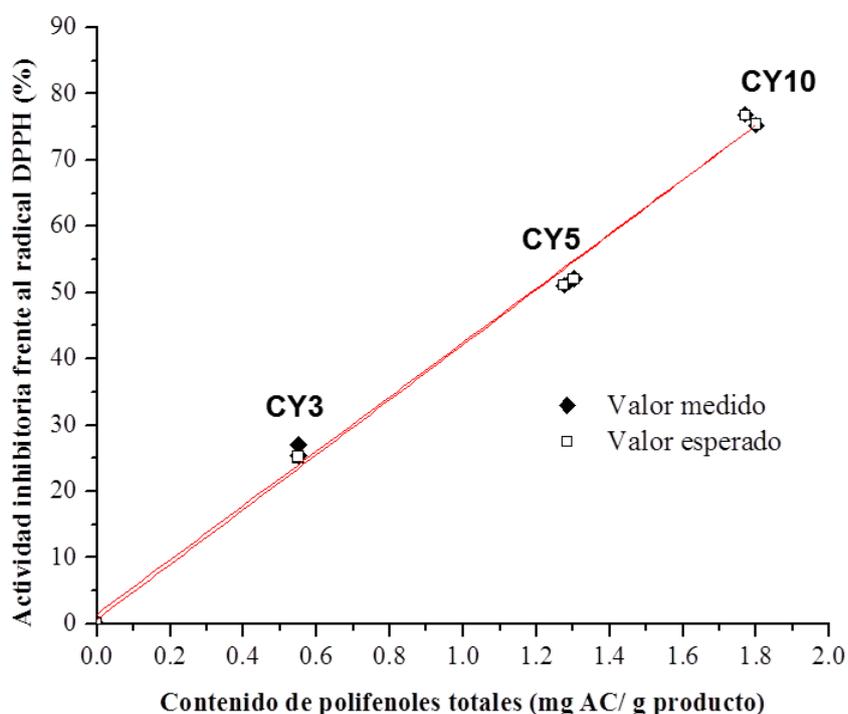


Figura 2.18. Comportamiento de la actividad antioxidante de los productos co-cristalizados en relación a su contenido de polifenoles totales.

Para evaluar el efecto del proceso de co-cristalización sobre la capacidad antioxidante del compuesto activo, se compararon los %I frente al DPPH de los extractos encapsulados con la actividad correspondiente a la misma cantidad de extracto líquido (sin co-cristalizar). Las concentraciones de polifenoles totales presentes en los co-cristalizados fueron usadas para extrapolar la actividad antioxidante esperada para el extracto sin co-cristalizar a partir de la Fig. 2.4. Los extractos de yerba mate encapsulados mostraron valores de %I similares a los esperados para la misma concentración de polifenoles en el extracto líquido. Esto indica que el proceso de co-cristalización no afectó significativamente la actividad antioxidante del extracto, conservándolo en forma efectiva.

De acuerdo a Brewer (2011), la actividad antioxidante de los compuestos puede incrementar, disminuir o mantenerse, por efecto de las condiciones de procesamiento (pH, temperatura, humedad). En este sentido, la estabilidad de los compuestos antioxidantes de la yerba mate frente al proceso de co-cristalización constituye una ventaja importante para el uso de este extracto en formulaciones de alimentos.

Un parámetro empleado comúnmente para evaluar la uniformidad en el contenido de compuesto activo es la desviación estándar relativa (%DER). Este parámetro se calcula como el cociente entre la desviación estándar y el promedio de las mediciones (Hill y col., 2009). Según la Farmacopea de Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007), un valor de %DER menor o igual al 6% es considerado aceptable para formas farmacéuticas sólidas (ej. polvos, comprimidos y cápsulas). Los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa mostraron %DER característicos de una distribución homogénea del extracto en el producto (%DER: 3.1-4.8). Deladino y col. (2007a), empleando extracto de yerba mate liofilizado, observaron una alta variación (%DER 19.5) en la uniformidad del contenido de los polvos. La incorporación del extracto líquido a la solución precursora constituye una ventaja importante para garantizar la dosis de compuesto activo en formulaciones alimentarias.

### **3. Estabilidad térmica de los productos encapsulados**

En la Fig. 2.19 se muestran los termogramas DSC obtenidos para el extracto seco de yerba mate, los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa (CY3 y CY10). El extracto seco mostró una única transición endotérmica cercana a los 85°C. El pico obtenido fue ancho posiblemente debido al efecto sinérgico de los compuestos presentes en el extracto que tienen transiciones en este rango de temperatura

(Anbinder y col., 2011). En el termograma de los aglomerados control se observó un pico endotérmico alrededor de 192°C típico de la fusión de la sacarosa (Beckett y col., 2006; Bhandari y Hartel, 2002).

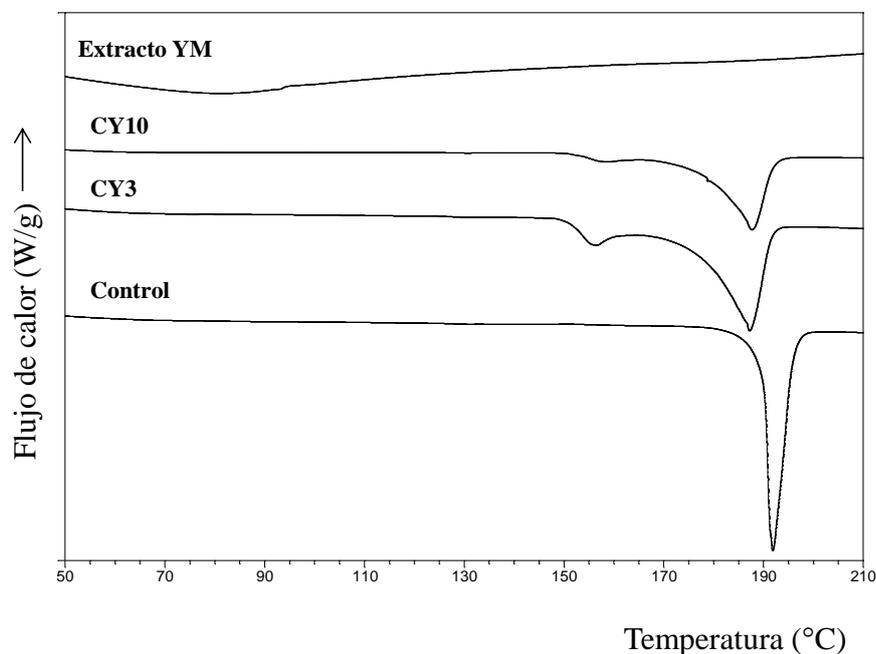


Figura 2.19. Termogramas DSC obtenidos para el extracto seco de yerba mate (YM), los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa (CY3 y CY10).

En los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa (CY3 y CY10), se observaron dos endotermas: La primera (Endoterma 1) ubicada alrededor de 150°C y la segunda (Endoterma 2) alrededor de 187°C. La Endoterma 1 no fue detectada en los aglomerados control, por lo que fue atribuida a componentes del extracto. Esta fue encontrada a mayor temperatura que en el extracto seco, probablemente debido a un incremento de la estabilidad térmica del producto por efecto de la encapsulación. Además, en los termogramas de las muestras CY3 y CY10 el pico de fusión de la sacarosa, detectado en los aglomerados control a 192°C, se ensanchó y se corrió hacia valores menores de temperatura (Endoterma 2).

En la Tabla 2.6 se muestran las entalpías de fusión ( $\Delta H$ ) y las temperaturas de pico ( $T_{in}$  y  $T_p$ ) de las endotermas observadas en la Fig. 2.19.

Tabla 2.6. Propiedades térmicas de los polvos con antioxidantes de yerba mate medidas por calorimetría diferencia de barrido (DSC).

Muestra	Endoterma 1			Endoterma 2		
	T <sub>in</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	ΔH (J/g)	T <sub>in</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	ΔH (J/g)
Control	nd*	nd	nd	190.2 ± 0.1	191.8 ± 0.01	121.9 ± 4.6
CY3	151.3 ± 0.3	155.2 ± 0.2	8.25 ± 0.4	180.4 ± 1.4	187.4 ± 0.3	76.6 ± 3.04
CY10	153.9 ± 0.2	156.9 ± 0.03	3.5 ± 0.6	181.3 ± 0.02	187.8 ± 0.06	86.4 ± 2.01

\*no detectada; CY3 y CY10: polvos preparados a partir de extractos con 3 y 10 g de yerba mate/100 mL de agua, respectivamente.

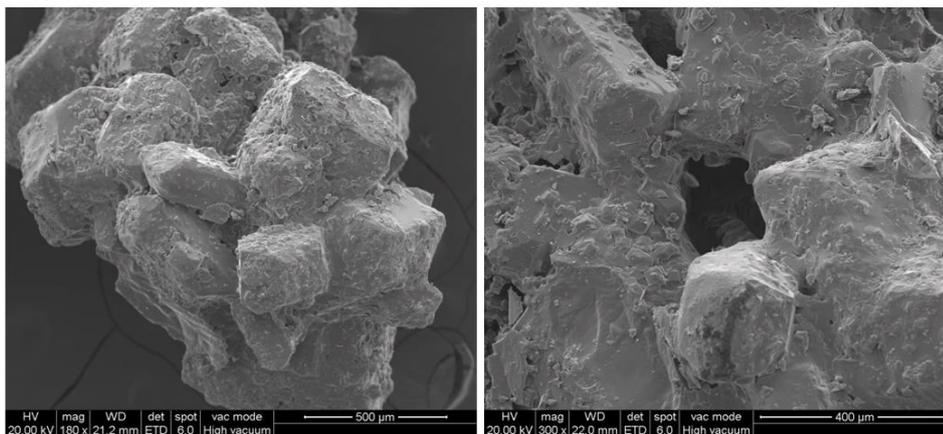
Según varios autores (Awad y Chen, 1993; Faria y col., 2003), cuando están presentes otros compuestos en el proceso de cristalización de la sacarosa, éstos pueden quedar atrapados en el interior de la red cristalina y/o quedar ocluidos entre los aglomerados. Beckett y col. (2006) y Bhandari y Hartel (2002) informaron que la incorporación de un componente en la red cristalina de la sacarosa puede ser evidenciada mediante DSC por un ensanchamiento de la endoterma correspondiente a la sacarosa y una disminución de su entalpía de fusión. Además este efecto es más pronunciado cuanto mayor es la cantidad de compuesto atrapada. Ambos productos, CY3 y CY10, mostraron una disminución significativa en la entalpía de fusión de la sacarosa (Endoterma 2), con respecto de los aglomerados control (Tabla 2.6). Al comparar los valores de ΔH obtenidos para CY3 y CY10, se observó una mayor disminución para CY3 respecto a CY10.

En contraste, al analizar los valores de entalpía de fusión atribuida a los compuestos del extracto (Endoterma 1), se observó un menor valor de ΔH para CY10 que para CY3. Este comportamiento fue atribuido a una mayor incorporación de los compuestos en la red cristalina de la sacarosa, cuando se empleó extracto de menor concentración (CY3). Mientras que a mayores concentraciones (CY10), una parte de los compuestos del extracto pudo haberse incorporada al cristal y otra pudo quedar atrapada entre los aglomerados.

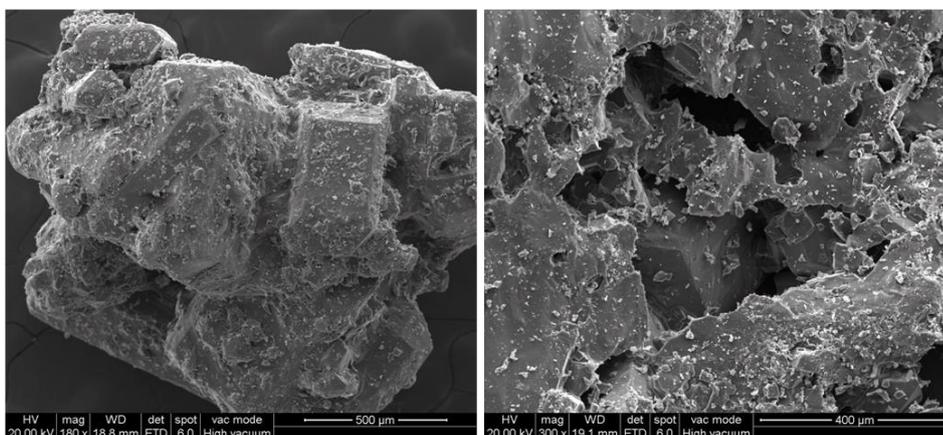
#### 4. Análisis morfológico y atributos de color

En la Fig. 2.20 se muestran micrografías SEM obtenidas para los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados con sacarosa (CY3 y CY10). Se observaron cristales aglomerados, tipo “cluster”, con cavidades irregulares entre ellos. Sardar y Singhal (2013) informaron resultados similares para oleorresinas de cardamomo co-cristalizadas en sacarosa.

### **Aglomerados control**



### **Polvos con extracto de yerba mate al 3% (CY3)**



### **Polvos con extracto de yerba mate al 10% (CY10)**

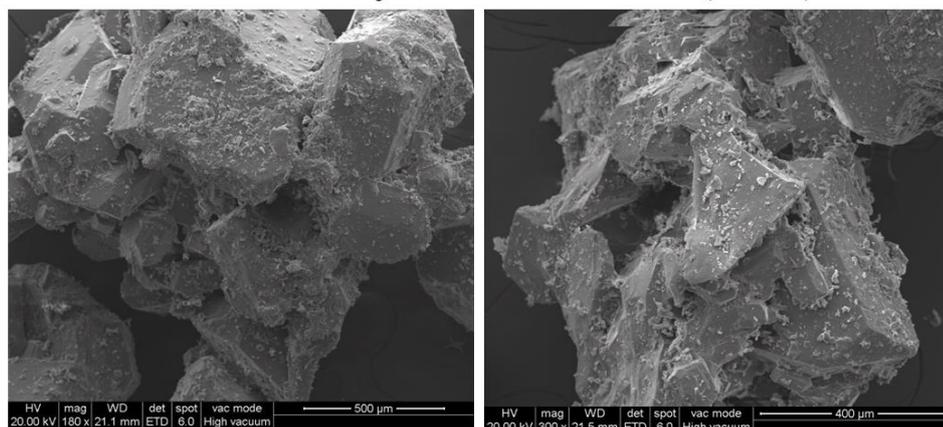


Figura 2.20. Micrografías SEM de la muestra control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.

Por otro lado, se observaron cambios significativos en los atributos de color de los polvos con extracto de yerba mate, en comparación con las muestras control (Tabla 2.7).

Los productos con extracto antioxidante mostraron una disminución en la luminosidad y un aumento en el croma, siendo mayor el efecto a mayores concentraciones de extracto empleadas.

Tabla 2.7. Atributos de color de los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate.

Muestra	Atributos de color		
	L	Croma	Angulo Hue (°)
Control	64.4 ± 4.2	2.3 ± 0.6	95.8 ± 1.2
CY3	55.3 ± 5.3	6.9 ± 1.6	99.3 ± 1.6
CY10	55.9 ± 2.2	11.03 ± 0.8	94.4 ± 0.4

CY3 y CY10: extractos de yerba mate al 3 y 10% co-cristalizados en sacarosa, respectivamente.

Con respecto al ángulo Hue se obtuvieron valores similares para todas las muestras. Las coordenadas de color obtenidas corresponden al color amarillo-verdoso característico del extracto de yerba mate.

### 5. Cinética de disolución en agua de los polvos con extracto de yerba mate

En la Fig. 2.21 se muestran las cinéticas de disolución en agua de los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate (CY3 y CY10), clasificados en dos tamaños de partícula (0.5-1 mm y de 1-2 mm). Además se muestra el perfil de disolución de la sacarosa para comparación.

Las concentraciones de extracto empleadas y el tamaño de partícula de los polvos no afectaron significativamente la solubilidad de estos materiales. Todas las muestras mostraron perfiles similares a la sacarosa disolviéndose totalmente después de 45s de ensayo. Este comportamiento fue atribuido a la alta solubilidad de la sacarosa en agua y a la rápida migración del solvente a través de los poros de los aglomerados permitiendo la liberación rápida del compuesto activo (Awad y Chen, 1993).

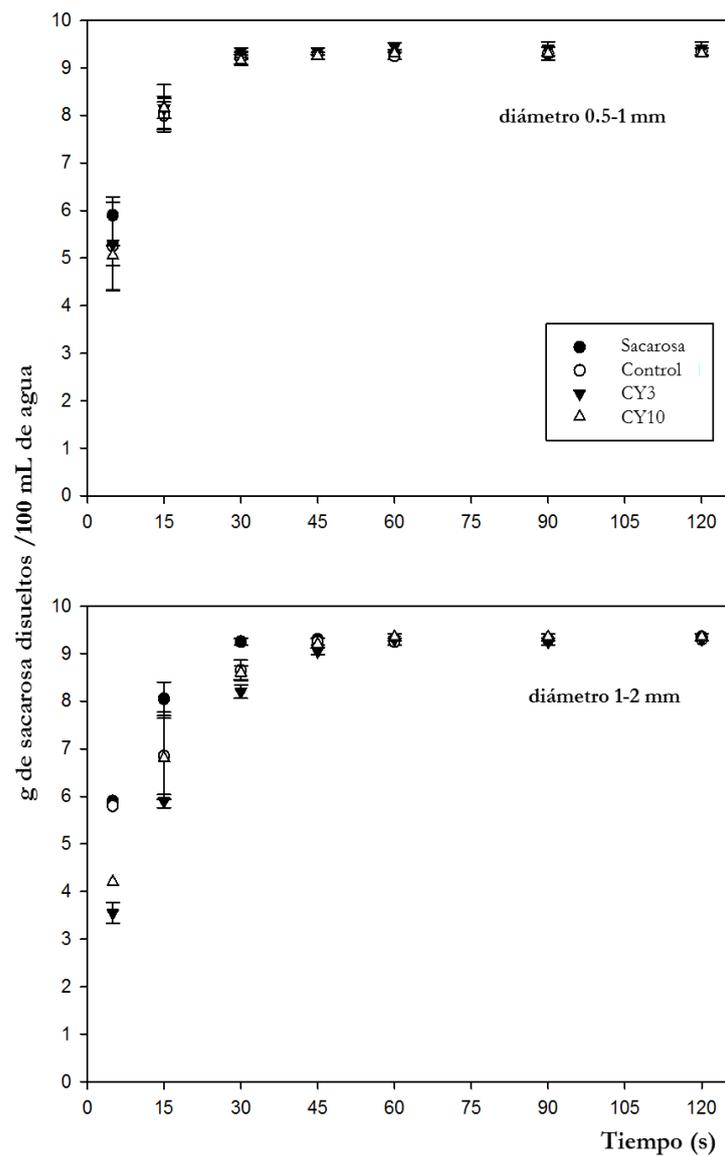


Figura 2.21. Cinética de disolución en agua de sacarosa comercial, aglomerados control y polvos con extracto de yerba mate obtenidos por co-cristalización (CY3 y CY10).

## 6. Propiedades de flujo

La fluidez es considerada una propiedad importante para la manipulación de materiales en polvo durante operaciones de producción y almacenamiento (Juliano y Barbosa-Cánovas, 2010). En la Tabla 2.8 se muestran los valores de ángulo de reposo dinámico e índice de Hausner (IH) obtenidos para los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.

Tabla 2.8. Propiedades de flujo de los aglomerados control y de los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.

Muestra	Tamaño de partícula (mm)	Ángulo de reposo (°)	IH
Control	0.5-1	41.8 ± 4.7	1.02 ± 0.04
	1-2	41.8 ± 4.9	1.10 ± 0.02
CY3	0.5-1	40.4 ± 4.4	1.03 ± 0.02
	1-2	43.2 ± 4.8	1.01 ± 0.02
CY10	0.5-1	40.4 ± 2.6	1.02 ± 0.02
	1-2	43.2 ± 5.4	1.02 ± 0.02

CY3 y CY10: extractos de yerba mate al 3 y al 10% co-cristalizados en matrices de sacarosa, respectivamente.

Según la Farmacopea de los EE.UU. (USP 30-NF 25, 2007) los valores de ángulo de reposo entre 25-50°, IH entre 1.0-1.34 e IC (%) <25 son característicos de materiales con propiedades de flujo aceptables. Mientras que valores mayores corresponden a productos de alta cohesividad y mala fluidez. Todas las muestras mostraron parámetros característicos de materiales con buena fluidez, independientemente de la concentración de extracto empleada y el tamaño de partícula.

Berté (2011) halló una alta pegajosidad y un difícil manipuleo para extractos de yerba mate solubles obtenidos mediante secado por atomización, sin adición de agentes encapsulantes. Resultados similares fueron observados por Deladino y col. (2007a) trabajando con extracto de yerba mate en polvo obtenido por liofilización. En ambos estudios la medición de la fluidez de los extractos en polvo no pudo ser llevada a cabo debido a las características mencionadas.

En la Fig. 2.22 se muestran los índices de Carr (IC) de los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en sacarosa. Además, se muestra el IC de sacarosa comercial para comparación.

El índice de Carr es considerado un parámetro útil para evaluar la fluidez de materiales y su compresibilidad, esta última propiedad es definida como la habilidad que posee un material para reducir en volumen bajo presión (Barbosa-Cánovas y col., 2005). Valores más bajos de IC son indicativos de mejor fluidez y compresibilidad.

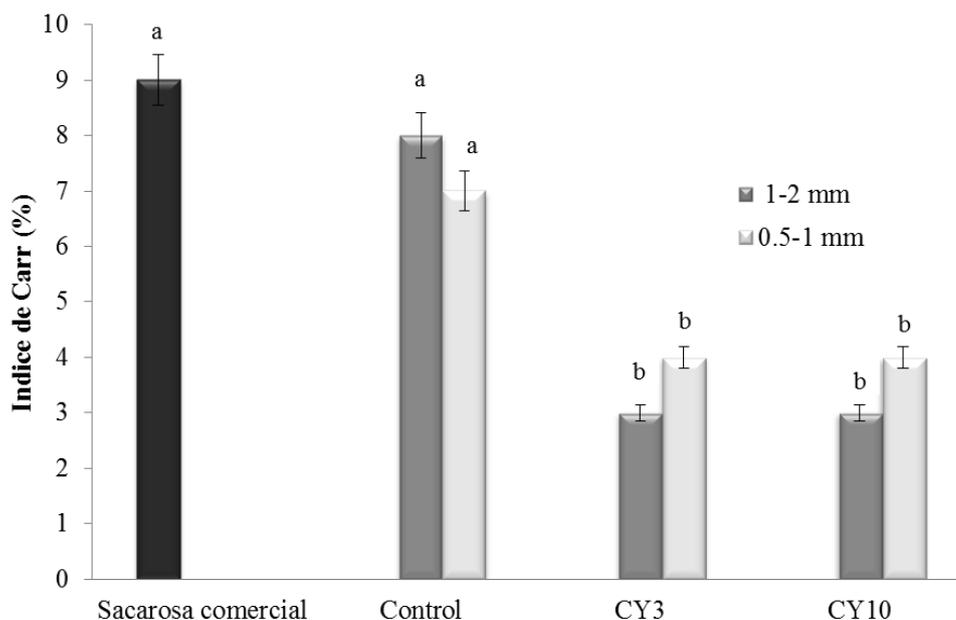


Figura 2.22. Índices de Carr (IC) de los aglomerados control y los extractos de yerba mate encapsulados con diferentes tamaños de partícula. El IC de la sacarosa comercial se muestra para comparación. CY3 y CY10: extractos de yerba mate al 3 y al 10% co-cristalizados en matrices de sacarosa, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los polvos con extracto de yerba mate (CY3 y CY10) mostraron valores de IC menores que los correspondientes a la sacarosa comercial y los aglomerados control. Este comportamiento fue atribuido a un efecto ligante del extracto. Se han informado valores de CI de 18, 26 y 31% para lactosa mohidratada, almidón de maíz y estearato de magnesio, respectivamente; los cuales son excipientes muy utilizados en la industria farmacéutica (Raymond y col., 2006).

## 7. Análisis de interacciones mediante FT-IR

En la Fig. 2.23 se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos para los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa.

Todas las muestras presentaron un espectro similar al de sacarosa (Brizuela y col., 2012; Gopi y col., 2013). Se observaron señales a 2941 y 2983  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos  $-\text{CH}_2$ , respectivamente. Las vibraciones de los grupos C-C fueron detectadas a 941 y 1069  $\text{cm}^{-1}$ .

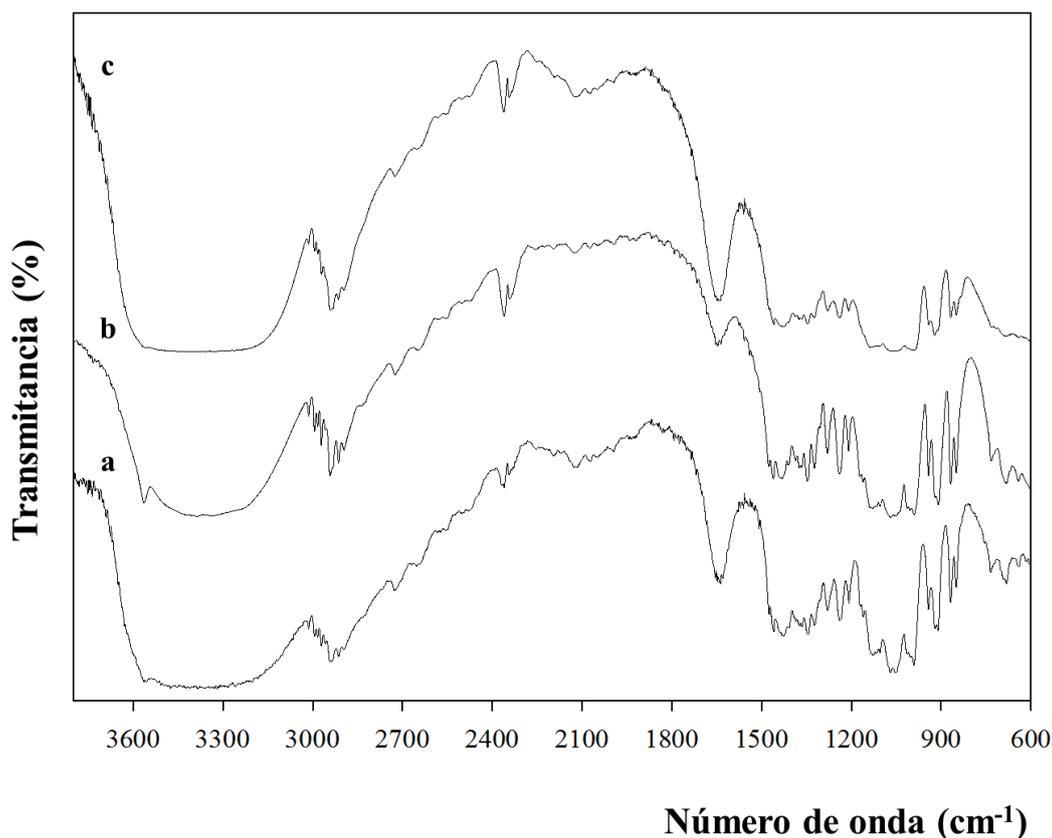


Figura 2.23. Espectros de infrarrojo de los aglomerados control (a) y los extractos de yerba mate al 3 (b) y al 10 % (b) co-cristalizados en matrices de sacarosa.

Señales características de los grupos C–O fueron encontradas a 995, 1011, 1059, 1061 y 1122  $\text{cm}^{-1}$ . Además se observó una amplia banda alrededor de 3319  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al estiramiento de los grupos –OH. En ninguno de los casos se detectaron señales atribuibles a los compuestos activos probablemente debido a la baja concentración de éstos en relación a la sacarosa.

### 8. Isotermas de adsorción

En la Fig. 2.24 se muestran las isotermas de adsorción de los aglomerados control y los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa. Los polvos con antioxidantes (CY3 y CY10) mostraron isotermas similares a las de la muestra control, indicando que la presencia de extracto no tuvo efectos significativos sobre la estabilidad de los productos. Estas isotermas fueron consideradas tipo 3 de acuerdo a la clasificación de BET, correspondiente a matrices con alto contenido de sólidos (Penner y Schmidt, 2013; Yao y col., 2011).

Todas las muestras presentaron valores bajos de adsorción de vapor de agua a HR menores que 85%. A mayores HR los productos mostraron un incremento rápido en su contenido de humedad atribuido al fenómeno de deliquesencia de la sacarosa (Salameh y col., 2006).

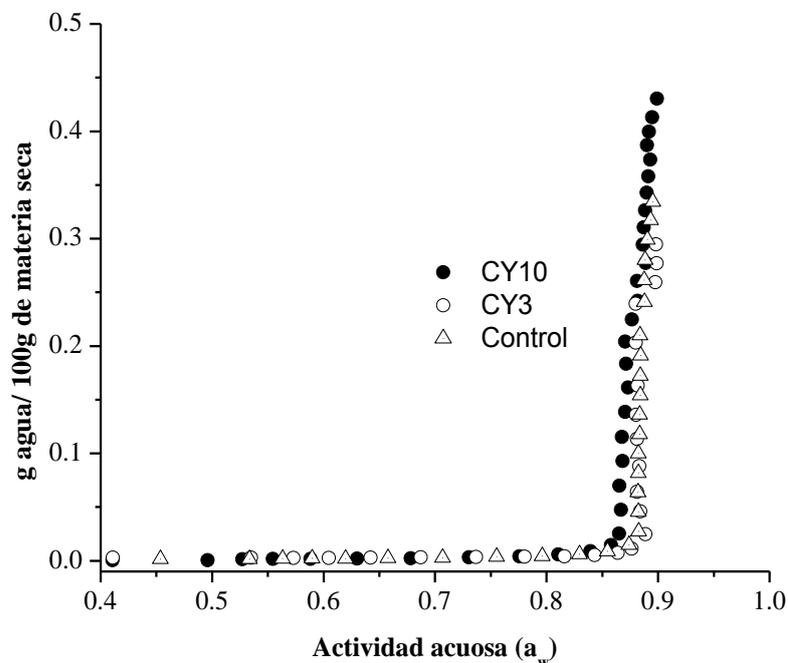


Figura 2.24. Isotermas de adsorción obtenidas para los aglomerados control y los extractos de yerba mate al 3 y al 10 % co-cristalizados en matrices de sacarosa. Tamaño de partícula: 0.5-1 mm.

La deliquesencia es una transición de fase entre el estado sólido y el líquido inducida por la interacción del material con el vapor de agua del ambiente. De acuerdo al modelo de van Campen y col. (1983) en sustancias solubles en agua este fenómeno se da en tres etapas: i) hidratación de la capa superficial de las partículas; ii) disolución de la superficie del material; y iii) saturación de la solución hasta alcanzar el equilibrio con el ambiente.

La humedad relativa a la que ocurre la deliquesencia es característica de cada material y es conocida como Humedad Relativa Crítica ( $HR_0$ ). Este parámetro fue extrapolado desde la isoterma de adsorción de los aglomerados control y los polvos con antioxidantes de yerba mate (CY3 y CY10) (Fig. 2.24), obteniendo valores de alrededor de 87% en todos los casos. Salameh y col. (2006) informaron humedades relativas críticas de 91, 85, 84 y 75% para glucosa anhidra, sacarosa, cloruro de potasio y cloruro de sodio, respectivamente.

Por otro lado, al comparar las isotermas de adsorción de los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa y las del extracto seco (Fig. 2.10), se encontró que la encapsulación permitió disminuir significativamente la capacidad de adsorción de agua de los extractos de yerba mate, manteniéndolos estables hasta humedades relativas del 85%. Los modelos matemáticos de GAB, Iglesias y Chirife, Oswin y Halsey no mostraron ajuste satisfactorio a los datos experimentales, exhibiendo valores bajos de  $R^2_{adj}$  y altos de  $R_{MSE}$  (>5%).

## 9. Estabilidad de los extractos de yerba mate encapsulados durante almacenamiento

### 9.1. Ganancia de agua e higroscopicidad

En la Fig. 2.25 se muestra el comportamiento del contenido de humedad en el tiempo de los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), la concentración del extracto y el tamaño de los aglomerados no mostraron efectos significativos sobre la ganancia de agua de los polvos ( $p > 0.05$ ). Todas las muestras alcanzaron un contenido de humedad constante a las 24 h de ensayo.

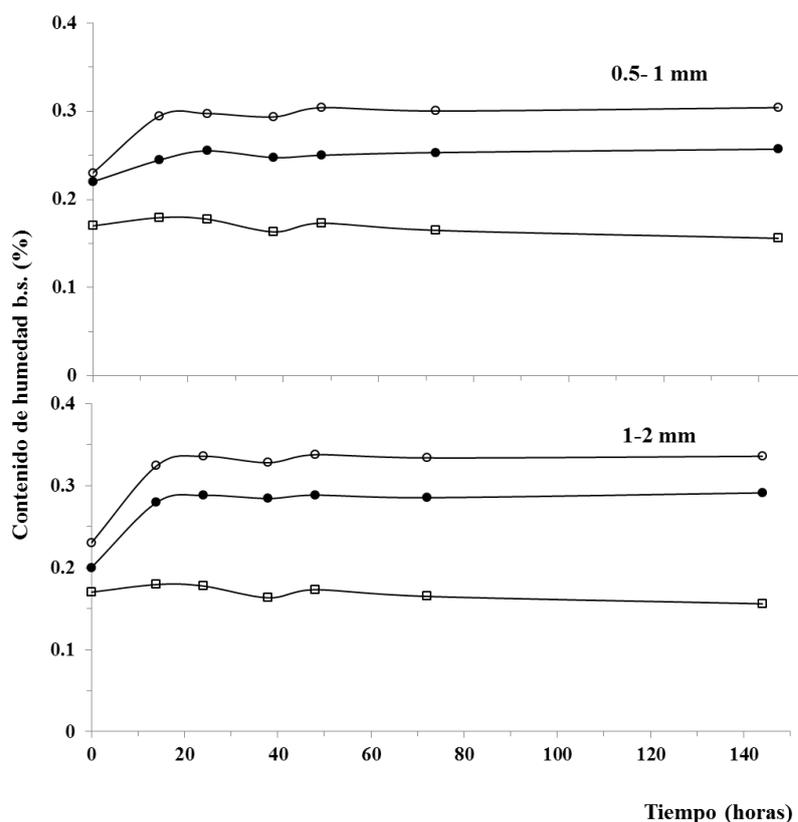


Figura 2.25. Cinética de ganancia de agua de los aglomerados control (□) y los extractos de yerba mate al 3 (○) y 10% (●) co-cristalizados en matrices de sacarosa, a 75% HR y 20°C.

La higroscopicidad (HG%) fue considerada como la masa de agua ganada durante el ensayo por cada 100 g de muestra seca (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Higroscopicidad (%) de los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate.

Muestra	HG (%)	
	0.5-1 mm	1-2 mm
Control	0.01	0.01
CY3	0.10	0.10
CY10	0.30	0.33

CY3 y CY10: extractos de yerba mate al 3 y al 10% co-cristalizados en matrices de sacarosa, respectivamente.

Todas las muestras presentaron valores de HG (%) muy bajos. De acuerdo con Newman y col. (2008) los materiales cristalinos con higroscopicidades inferiores al 2% bajo condiciones de 75% HR y 25°C pueden ser considerados poco higroscópicos y muy estables. Estos productos tienen importantes ventajas desde el punto de vista industrial porque pueden conservarse en empaques de menor costo. Mientras que los productos con HG (%) entre el 2-15 son considerados moderadamente higroscópicos, y pueden sufrir reacciones de deterioro aceleradas durante el almacenamiento tales como disolución y/o deliquesencia, ataque de microorganismos, entre otros (Schultheiss y Newman, 2009).

## 9.2. Contenido de compuestos activos y actividad antioxidante

Se analizó la estabilidad química de los productos en términos del contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante. No se observaron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en la concentración de polifenoles totales, medida por el método de Folin-Ciocalteu, a lo largo del período de almacenamiento (Fig. 2.26 a).

Yatsu y col. (2011) analizando la estabilidad de extracto de yerba mate soluble obtenido por secado por atomización, frente a la radiación ultravioleta y la temperatura, encontraron que los polvos de yerba mate fueron foto-estables por 48 h y mantuvieron su contenido de polifenoles totales durante 4 meses de almacenamiento a 40°C y 75% HR.

Con respecto a la actividad antioxidante los polvos con extracto de yerba mate mostraron fluctuaciones en el porcentaje de inhibición frente al DPPH• alcanzando al final del ensayo una pérdida de actividad del 50%, con respecto al valor inicial (Fig. 2.26 b). En consecuencia, no se encontró una correlación lineal entre el contenido de polifenoles

totales y el porcentaje de inhibición frente al DPPH• durante el almacenamiento. Piljac-Žegarac y col. (2009) y Viña y Chaves (2006) informaron resultados similares, los cuales fueron atribuidos a posibles modificaciones en el perfil cuali-cuantitativo de los compuestos fenólicos de las muestras por efecto de la humedad relativa y la temperatura. Según Pinelo y col. (2004), el aumento en la actividad antioxidante es debido a la fuerte tendencia de los polifenoles a sufrir reacciones de polimerización, dando lugar a oligómeros con mayor área disponible para la deslocalización de cargas. En contraste, cuando el grado de polimerización excede un valor crítico, disminuye la actividad anti-radicalaria por efecto del aumento de la complejidad molecular y el impedimento estérico.

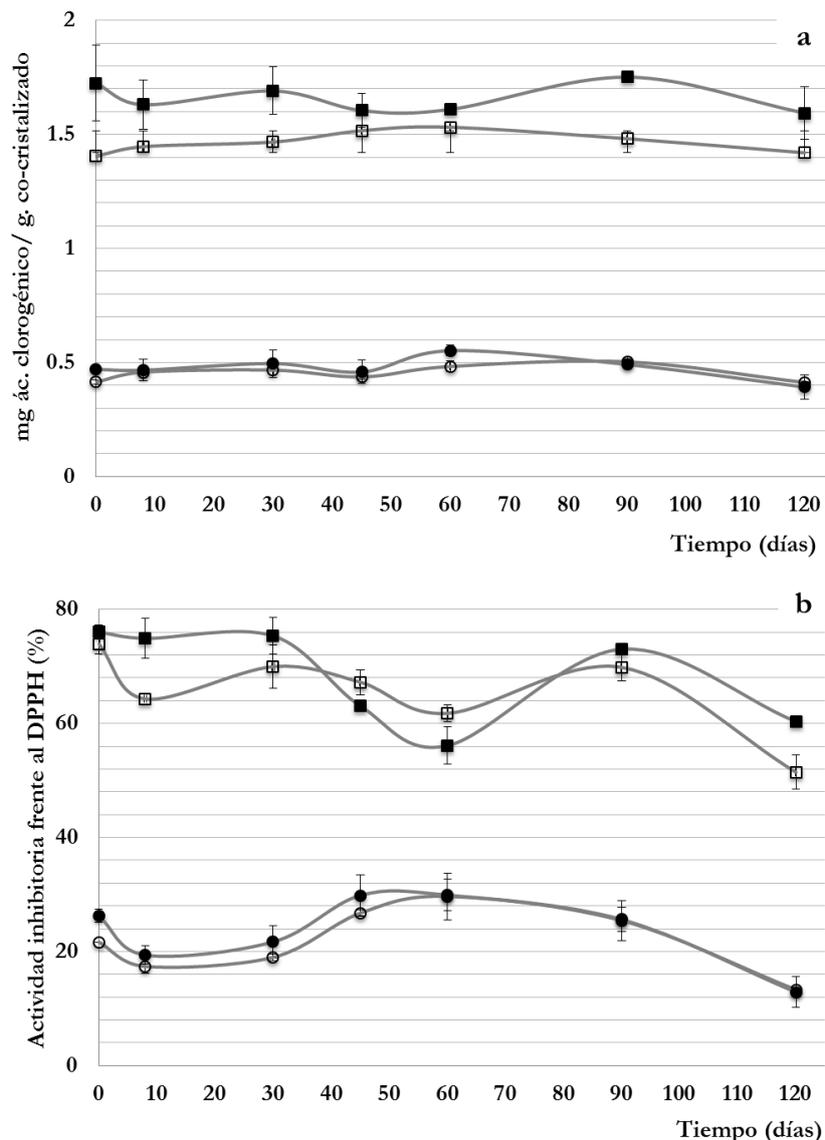


Figura 2.26. Estabilidad química de los polvos con extracto de yerba mate durante el almacenamiento: (a) contenido de polifenoles totales y (b) actividad antioxidante frente al DPPH•. (o) CY3, diámetro (d)=0.5-1 mm, (●) CY3, d= 1-2 mm, (□) CY10, d=0.5-1 mm y (■) CY10, d=1-2 mm.

En la Fig. 2.27 se muestran los cromatogramas obtenidos para los extractos de yerba mate encapsulados, antes y después del almacenamiento.

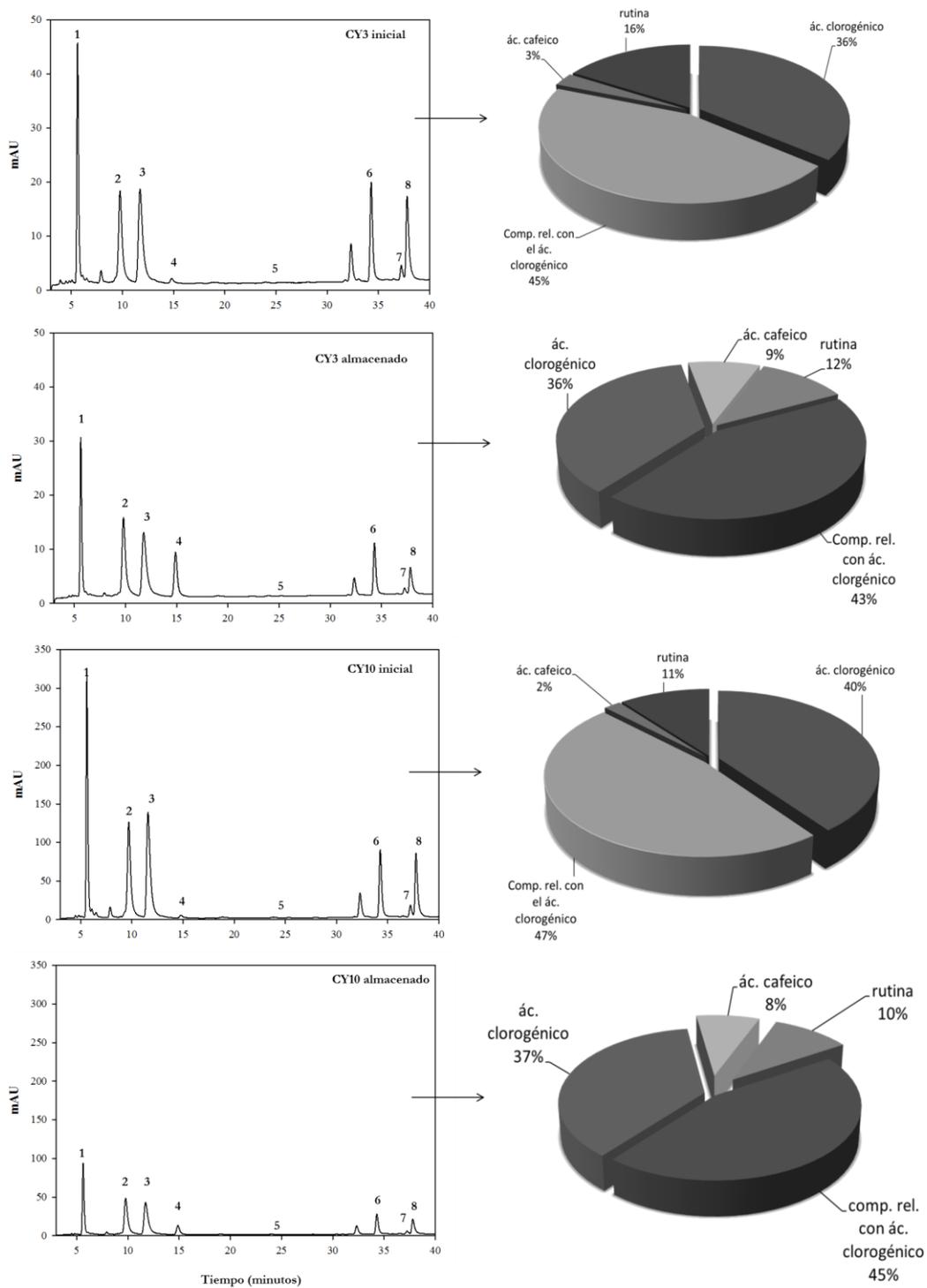


Figura 2.27. Cromatogramas HPLC obtenidos para los extractos de yerba mate encapsulados, antes y después de 120 días de almacenamiento a 75% HR y 20°C ( $\lambda=330$  nm). La cafeína y la rutina no están presentadas a sus longitudes de onda de máxima absorción. Picos: 3. ácido clorogénico; 4. ácido cafeico; 5. cafeína y 7. rutina. Picos 1, 2, 6 y 8 compuestos no identificados. Los gráficos circulares muestran la composición de polifenoles de los polvos.

Similar a lo observado en el cromatograma de los extractos acuosos, se detectaron picos a distintos tiempos de retención ( $t_r$ ) correspondientes al ácido clorogénico ( $t_r = 12$  min), ácido cafeico ( $t_r = 15$  min), rutina ( $t_r = 37$  min) y cafeína ( $t_r = 25$  min). Además se detectaron otros compuestos (picos 1, 2, 6 y 8) cuyos espectros DAD mostraron alta coincidencia con el del ácido clorogénico. Estos fueron considerados como "compuestos relacionados con el ácido clorogénico"; su concentración fue calculada como la suma de las áreas de los picos 1, 2, 6 y 8 y expresada como mg equivalentes de ácido clorogénico. A tiempo inicial, los productos CY3 y CY10 mostraron porcentajes similares de compuestos fenólicos como se muestra en los gráficos circulares (Fig. 2.27). Al final del almacenamiento se observaron cambios en la composición de polifenoles de ambas muestras encontrando un incremento en la cantidad de ácido cafeico y una disminución en el contenido de rutina, ácido clorogénico y sus derivados.

En la Tabla 2.10 se muestran las concentraciones de polifenoles y de cafeína presente en los polvos con extracto de yerba mate antes y después de almacenados, determinadas mediante HPLC. Los porcentajes de cambio en la concentración de cada compuesto activo (%C) se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\%C = \left( \frac{C_{120} - C_0}{C_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec.2.17}$$

donde  $C_0$  es la concentración inicial de compuesto activo y  $C_{120}$  es la concentración del mismo después de 120 días de almacenamiento. Valores de  $\%C < 0$  son indicativos de degradación y  $\%C > 0$  corresponden a un aumento en la concentración del compuesto activo al final del almacenamiento.

Los polvos CY10 mostraron una mayor reducción de la concentración de compuestos activos en comparación con CY3, con excepción de la rutina. Este comportamiento está de acuerdo con lo observado mediante DSC (Fig. 2.19), siendo que las muestras CY3 mostraron una mayor incorporación de los compuestos en la red cristalina de la sacarosa. En contraste, ambas muestras (CY3 y CY10) presentaron una mayor cantidad de ácido cafeico que la inicial (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína de los polvos con extracto de yerba mate antes y después de almacenados, determinadas mediante HPLC.

Compuesto activo	CY3			CY10		
	Fresco	Almacenado	C (%)	Fresco	Almacenado	C (%)
PT <sup>a</sup>	0.54	0.58	7.4	1.72	1.75	1.7
AC <sup>b</sup>	0.11	0.09	-19.1	0.26	0.18	-30.29
D. AC <sup>b</sup>	0.14	0.11	-22.2	0.31	0.22	-28.98
A. cafeico <sup>b</sup>	0.009	0.02	163.7	0.01	0.04	205.35
Rutina <sup>b</sup>	0.05	0.03	-44.3	0.07	0.05	-28.98
Cafeína <sup>b</sup>	0.09	0.07	-16.1	0.23	0.10	-58.16

Máxima desviación estándar: 0.07. <sup>a</sup> mg de ác. clorogénico/ g de polvo; <sup>b</sup> mg de compuesto activo/g de polvo. PT: polifenoles totales; AC: ácido clorogénico; D.AC: compuestos derivados del ácido clorogénico.

Según varios autores (De Sotillo y col., 1994; Fang y Bhandari, 2011), algunos polifenoles, incluyendo el ácido clorogénico, pueden degradarse y/o polimerizarse dando lugar a otros compuestos por efecto de la presencia de oxígeno, la humedad relativa, la radiación ultravioleta y la temperatura. En este sentido, el incremento en la concentración de ácido cafeico puede ser atribuido a la degradación del ácido clorogénico y sus compuestos relacionados en sus ácidos constitutivos durante el almacenamiento.

Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres formada por el ácido quínico y los ácidos trans-cinámicos, más comúnmente cafeico, p-cumárico y ácido ferúlico (Jaiswal y col., 2010). Dugo y col. (2009) mediante cromatografía líquida bidimensional encontraron alrededor de 26 diferentes compuestos derivados del ácido clorogénico en extractos de yerba mate. Por su parte, Jaiswal y col. (2010) con el empleo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS), lograron identificar una cantidad aún mayor de dichos compuestos, encontrando alrededor de 42 isómeros distintos.

El perfil cuali-cuantitativo de polifenoles determinado por HPLC permitió correlacionar la disminución de la actividad antioxidante frente al DPPH• con la disminución en el contenido de ácidos clorogénicos y rutina en las muestras almacenadas. Anesini y col. (2012) estudiaron la contribución de la cafeína y los compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante del extracto de yerba, encontrando que los ácidos clorogénicos presentan la mayor actividad captadora de radicales DPPH• seguidos del ácido cafeico y la rutina. Resultados similares fueron informados por Deladino y col. (2013) usando un método de fotoluminiscencia. En ambos estudios, no se detectó un poder antioxidante para la cafeína.

### 9.3. Patrones de difracción de rayos X y análisis morfológico de los polvos con extracto de yerba mate almacenados

Se analizó la estructura de los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa antes y después del almacenamiento, mediante difracción de rayos X (Fig. 2.28).

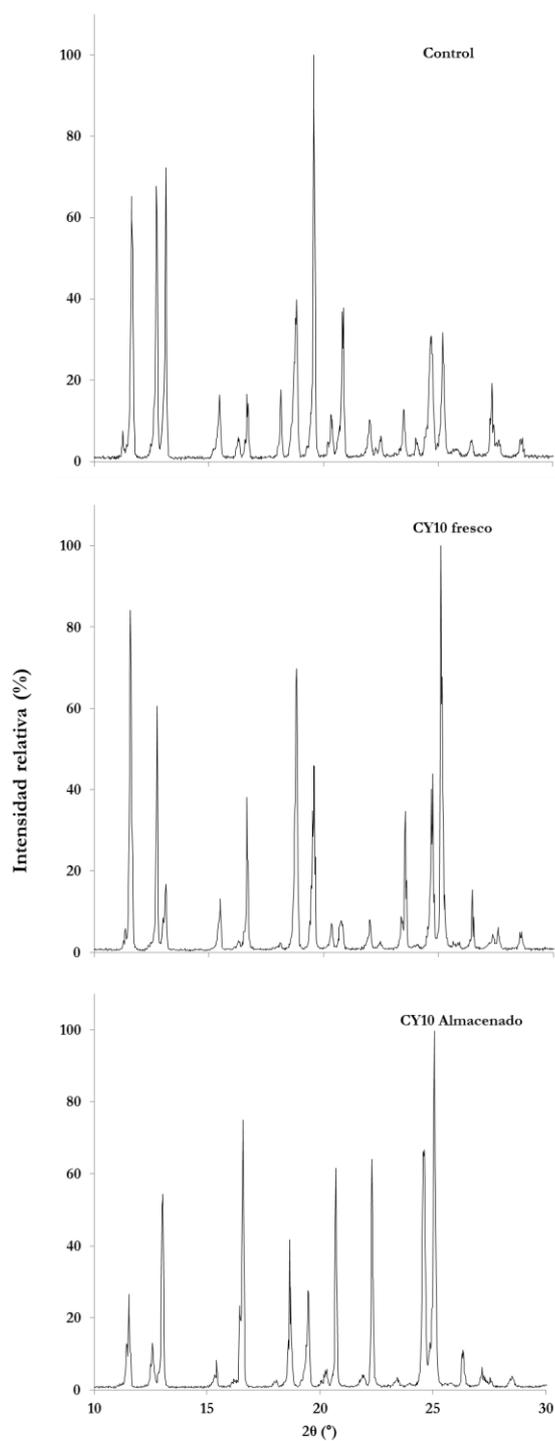


Figura 2.28. Patrones de difracción de rayos X de los polvos con extracto de yerba mate frescos y almacenados a 75% HR y 20°C.

En la técnica de rayos X, una fase cristalina dada siempre produce un patrón de difracción característico (o “huella dactilar”), bien se halle en estado puro o como constituyente de una mezcla, permitiendo estimar la efectividad del proceso de encapsulación (Dorset, 1998). Como se observa en la Fig. 2.28, los patrones de difracción de las muestras control y los polvos CY10 presentaron alta coincidencia con el de sacarosa cristalina encontrando picos de mayor intensidad a  $2\theta$  ( $^{\circ}$ )= 11.7, 12.7, 18.8, 19.6, 24.8 y 25.2 (JCPDS, 1999). En ningún caso, se observaron señales correspondientes al extracto de yerba mate, ni tampoco zonas amorfas indicando que luego del proceso de co-cristalización la sacarosa se mantiene en estado cristalino.

Los polvos CY10 almacenados mostraron valores de intensidad relativa más altos que los productos sin almacenar indicando una mayor cristalinidad (Fig. 2.28). Este comportamiento pudo ser debido a la cristalización de algunos componentes del extracto durante el almacenamiento.

Por otro lado se analizó el grado de apelmazamiento entre partículas (“caking”) al final del almacenamiento, mediante microscopía SEM (Fig. 2.29). Los polvos con extracto de yerba mate con tamaño de partícula entre 1-2 mm, no mostraron evidencia de apelmazamiento (“caking”) durante el período de almacenamiento. En el caso de los polvos con menor tamaño (entre 0.5-1 mm) se encontraron partículas agregadas de alrededor de 1.5 mm de diámetro.

La agregación y aglutinación de partículas son problemas comunes en operaciones de procesamiento de materiales en polvo. Varios autores (Billings y col., 2006; Hartmann y Palzer, 2011), han informado modelos que explican las etapas en las que ocurre este fenómeno, dentro de las cuales se encuentran: i) contacto entre partículas, ii) formación de puentes líquidos y iii) formación de puentes sólidos. Según Mathlouthi y Rogé (2003) la tendencia de los polvos a apelmazarse es menor para mezclas con bajo contenido de partículas finas, con forma y distribución de tamaño homogénea, bajos contenidos humedad y alta humedad relativa crítica ( $HR_0$ ). Estas cualidades físicas disminuyen el área superficial específica, y el número de puntos de contacto entre partículas adyacentes.

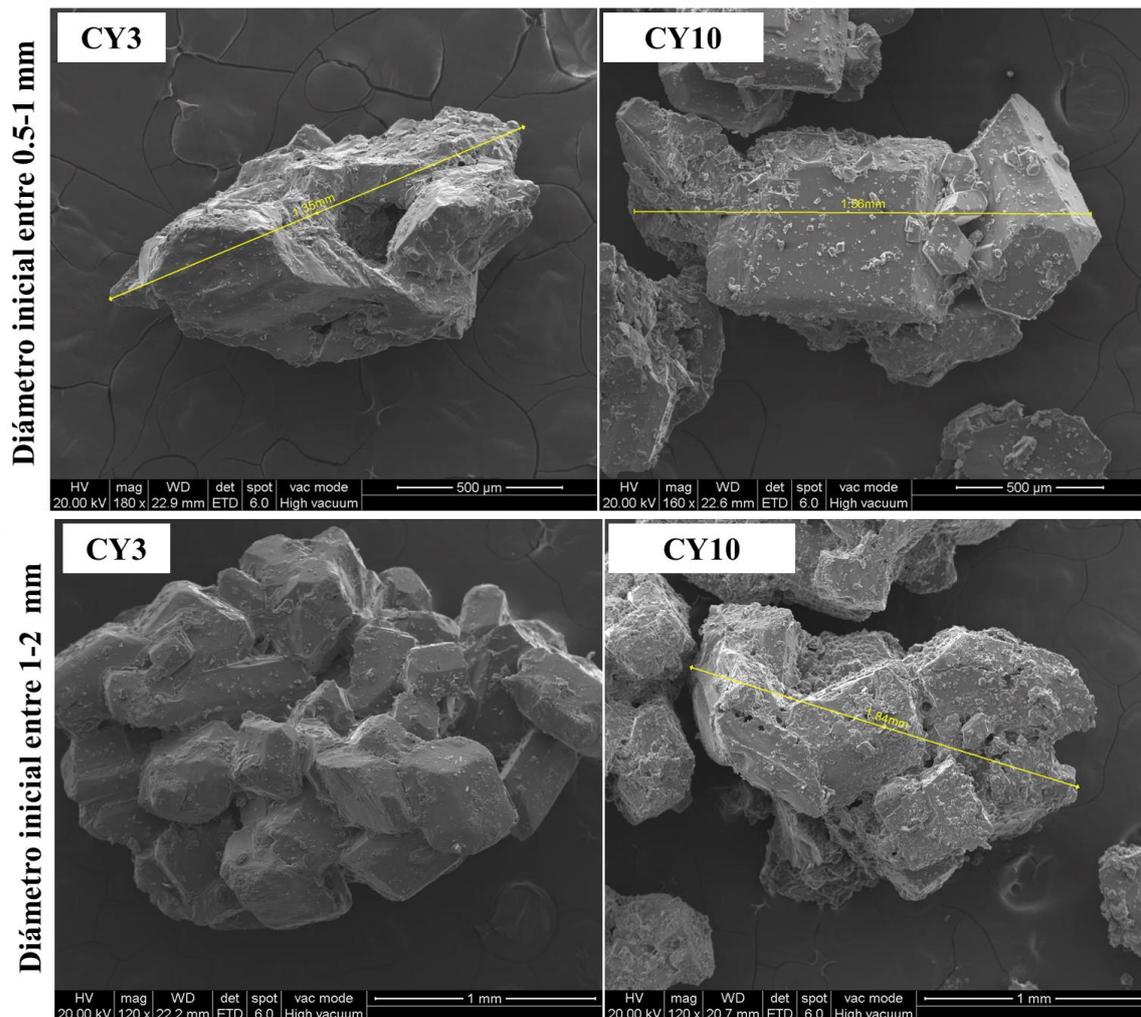


Figura 2.29. Micrografías SEM de los polvos con extracto de yerba mate obtenidas después de 120 días de almacenamiento.

## 10. Aplicación de los extractos de yerba mate co-cristalizados con sacarosa en la preparación de bebidas refrescantes

Se prepararon bebidas refrescantes a base de polvos con extracto de yerba mate (CY10), ácido cítrico, esencia de limón y agua. Los polvos CY10 fueron seleccionados debido a que éstos presentaron el mayor contenido de polifenoles (antioxidantes) y de cafeína (energizante) (Tabla 2.10). En este sentido, una porción de 100 mL de bebida aportaría alrededor de 17 mg de polifenoles totales; siendo esta contribución importante comparada con la de bebidas con mayor frecuencia de consumo como el jugo de naranja (50 mg/100mL), té (76 mg/100mL) y café (200 mg/100mL) (Saura-Calixto y Goñi, 2006).

En la Fig. 2.30 se muestran los puntajes para cada atributo obtenidos para las bebidas refrescantes sin (control) y con (CY10) extracto de yerba mate. Para mayor claridad de los resultados, la escala hedónica fue agrupada en tres intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

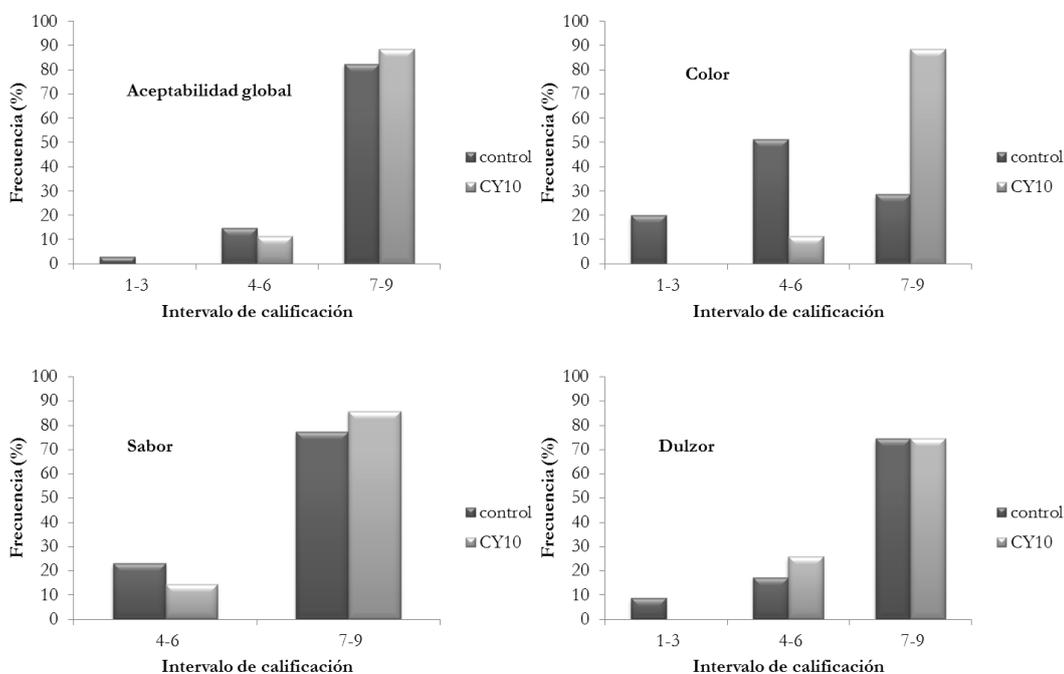


Figura 2.30. Atributos sensoriales de las bebidas con y sin extracto de yerba mate. La escala hedónica fue agrupada en tres intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

Las diferencias entre las muestras fueron evaluadas mediante un test de Student, comparando los valores de  $t$  experimentales ( $t_{exp}$ ) (Ec. 2.12) con los  $t$  de la tabla de “valores críticos para  $t$  de Student” ( $t_{tab}$ ) correspondientes al grado de libertad y los niveles de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 y 0.10 (Tabla 2.11). La hipótesis nula establecida fue que no existen diferencias entre el grado de aceptación global de las muestras. Para valores de  $t_{tab} > t_{exp}$  se aceptó la hipótesis nula y viceversa. No se observaron diferencias significativas en la aceptabilidad general de las muestras con y sin antioxidantes de yerba mate. Las dos bebidas (control y CY10) mostraron altos porcentajes de aceptación global ( $> 80\%$ ) (Fig. 2.30). Para la bebida con extracto de yerba mate algunos evaluadores añadieron en las observaciones que ésta se asimilaba a un “té instantáneo sabor a limón”.

Tabla 2.11. Valores de t-Student experimentales ( $t_{exp}$ ) y tabulados ( $t_{tab}$ ) para cada atributo

	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.1$		
$t_{tab}$	2.04	1.69		
	Aceptabilidad general	Color	Sabor	Dulzor
$t_{exp}$	1.61	6.02	0.76	0.07

Asimismo, no se observaron diferencias significativas ( $t_{tab} > t_{exp}$ ) en el sabor y el dulzor de las bebidas. Sin embargo, para el atributo de dulzor se obtuvieron algunas puntuaciones en el intervalo de calificación de 1-3 (“me disgusta mucho”) sólo para la bebida control (Fig. 2.30).

Con respecto al color, se encontraron diferencias significativas ( $t_{exp} > t_{tab}$ ) entre las muestras. El color de las bebidas con extracto de yerba mate mostró una mayor aceptación (89%) por parte de los jueces que el de la bebida control (29%). Este comportamiento fue atribuido a que el extracto de yerba mate dio una coloración natural a la bebida (amarilla-verdosa) similar a la de productos comerciales; lo que constituye una ventaja desde el punto de vista industrial dado a que el producto no requeriría de la adición de colorantes artificiales.

## Conclusiones parciales

1. Los extractos acuosos de yerba mate mostraron un alto contenido de polifenoles totales, siendo la contribución de los ácidos clorogénicos la más importante.
2. Además presentaron una elevada actividad antioxidante inhibiendo el radical libre DPPH y también reduciendo iones férricos, inclusive a bajas concentraciones.
3. Los extractos secos mostraron una temperatura de transición vítrea superior a la temperatura ambiente y un patrón de difracción de rayos característico de matrices amorfas.
4. El empleo del extracto líquido como solvente de la mezcla precursora, mejoró la eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos y favoreció su distribución homogénea en los polvos.
5. La capacidad antioxidante del extracto de yerba mate no fue afectada por el proceso de co-cristalización, ni por la presencia de los agentes encapsulantes.
6. Los extractos de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa mostraron color y apariencia aceptable, alta solubilidad, buena fluidez y baja higroscopicidad.
7. El contenido de compuestos fenólicos en los productos se mantuvo estable durante 120 días de almacenamiento. Sin embargo, se observaron fluctuaciones en la actividad anti-radicalaria.
8. No se observó la formación de estructuras amorfas, ni tampoco apelmazamiento de los polvos al final del almacenamiento
9. Se desarrolló una bebida refrescante, empleando los antioxidantes de yerba mate co-cristalizados en matrices de sacarosa, con una alta aceptación sensorial.

## Capítulo 3. SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE ZINC

### Introducción

El zinc (Zn) es un elemento esencial para el organismo que participa en la expresión génica, el crecimiento y la diferenciación celular, la cicatrización de heridas y la respuesta inmune (Milner, 1990; Salgueiro y col., 2000). Este mineral actúa como cofactor de más de 300 enzimas, algunas de ellas implicadas en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo celular y en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas (Zago y Oteiza, 2001). Varios autores han reportado que el Zn es capaz de proteger membranas de la oxidación, ocupando los sitios cargados negativamente en los que podrían unirse metales de transición que favorecen las reacciones de degradación (Salgueiro y col., 2000; Tapiero y Tew, 2003). Además, induce la formación de metalotioneínas, las cuales intervienen en la eliminación de minerales tóxicos, como el cadmio, y en la protección frente a especies reactivas de oxígeno (Salgueiro y col., 2000; Tapiero y Tew, 2003).

Los alimentos con mayor contenido de zinc de alta absorción son las carnes rojas y las vísceras (hígado y riñón), que contienen entre 2.9-6 mg de Zn/100 g (WHO y FAO, 2004). Sin embargo, por razones culturales y por su alto costo, estos productos son consumidos en bajas cantidades por las poblaciones de riesgo; siendo mayores las consecuencias para individuos con dietas basadas en cereales y legumbres, que contienen cantidades significativas de inhibidores de la absorción de zinc, tales como los fitatos (Brown y col., 2004).

En la Tabla 3.1 se muestran los valores de ingesta diaria recomendada (IDR) de zinc en función de la edad, el sexo y la situación fisiológica (Brown y col., 2004; WHO y FAO, 2004). Estos requerimientos pueden encontrarse aumentados en individuos con diarrea aguda, cirrosis hepática, diabetes, insuficiencia renal o pancreática, inmunodepresión, fibrosis quística, enteropatías, entre otros (Brown y col., 2004).

La toxicidad por ingesta excesiva de zinc es poco frecuente. Sin embargo, se pueden presentar casos de toxicidad aguda con ingestas entre 225-450 mg, causando dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, entre otros. La toxicidad crónica se da con ingestas diarias de más de 150 mg por un período de tiempo prolongado generando deficiencia de cobre y hierro, alteración de la función inmune, reducción de lipoproteínas de alta densidad, entre otros (Brown y col., 2004).

Tabla 3.1. Valores de ingesta diaria recomendada de zinc en función de la edad, el sexo y situación fisiológica.

Etapa de la vida	Edad	mg Zn/día
Lactantes	0-6 meses	2
	6-11 meses	3
Niños	1-3 años	3
	4-8 años	5
	9-13 años	8
Hombres	14-18 años	11
	> 19 años	11
Mujeres	14-18 años	9
	> 19 años	8
Embarazo	> 19 años	11
Lactancia	> 19 años	12

Fuente: WHO y FAO (2004); International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) (Brown y col., 2004).

La deficiencia de zinc es uno de los problemas de nutrición más frecuentes en países en vías de desarrollo y desarrollados. Sin embargo, existen dificultades para determinar los valores reales de carencia debido a la falta de un marcador biológico confiable de estado nutricional de zinc (Pizarro y Calvo, 2009). El retardo de crecimiento infantil es uno de los indicadores funcionales más empleados para estimar la carencia de este micronutriente (Fig. 3.1).

Las principales causas de deficiencias de Zn en seres humanos son: a) consumo de alimentos con cantidades insuficientes del mineral, respecto de los requerimientos diarios; b) ingesta de dietas que contienen zinc de baja absorción, y c) dietas con alto contenido de inhibidores de la absorción de zinc (Sandstead, 2000). La deficiencia de zinc puede generar desarrollo neurológico anormal, retraso en el crecimiento y de la maduración sexual y mayor riesgo de padecer enfermedades infecciosas tales como: diarrea aguda, neumonía, malaria, tuberculosis y enfermedades de la piel.

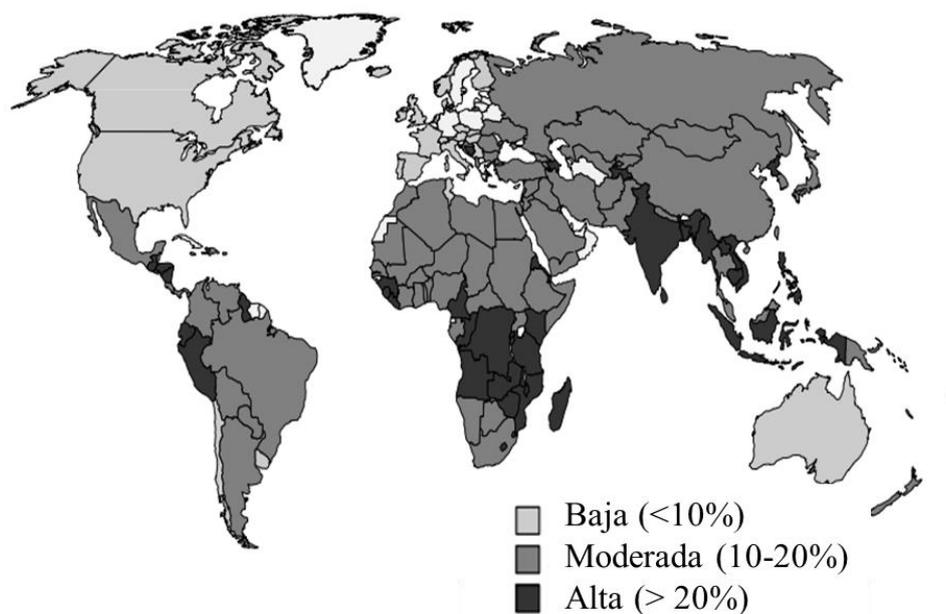


Figura 3.1. Mapa de prevalencia de deficiencia de zinc en niños menores de 5 años, basado en el índice de retardo de crecimiento. Fuente: Brown y col. (2004).

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son una de las causas más frecuente de muerte infantil en el mundo, generando alrededor de 2-3 millones de muertes por año en países de Asia, África y América Latina (WHO, 2006). Otro grupo frecuentemente afectado por las EDA está constituido por las personas que viajan a países tropicales o subtropicales. Entre el 40-60% de los viajeros se enferman con diarrea durante las dos primeras semanas de estadía, siendo el número de personas afectadas de alrededor de 11 millones por año (Al-Abri y col., 2005). Varios estudios han demostrado la eficacia del Zn en el tratamiento de EDA. Este mineral disminuye el volumen de pérdida de fluidos, acorta la duración del episodio diarreico y reduce el riesgo de incidencia de la enfermedad (Bahl y col., 2002; Berni Canani y col., 2011; Dennehy, 2005; Fuchs, 1998; Walker y col., 2009). Por esta razón, las recomendaciones actuales de WHO y UNICEF para el tratamiento efectivo de las EDA incluyen: añadir zinc a las soluciones de rehidratación oral de osmolaridad reducida y la administración de tabletas con zinc (10-20 mg/día) entre 10 y 14 días a partir del inicio de la EDA (WHO, 2006, 2007; WHO y UNICEF, 2004).

Las principales estrategias de intervención empleadas para la suplir los requerimientos de Zn de la población en riesgo son: la fortificación, la suplementación y la modificación y/o diversificación alimentaria (Gibson y Ferguson, 1998; Shrimpton y col., 2005). Estas alternativas pueden ser combinadas para lograr efectos sinérgicos favorables.

Según Pizarro y Calvo (2009) la suplementación resulta una estrategia efectiva a corto plazo, mientras que la fortificación y la modificación de la dieta son estrategias efectivas a mediano y largo plazo, respectivamente.

Algunos de los compuestos fuentes de zinc considerados por la FDA como GRAS son: óxido de zinc, sulfato de zinc mono y heptahidratado, gluconato de zinc, acetato de zinc y cloruro de zinc. El sulfato de zinc es el más empleado por su amplia disponibilidad y bajo costo. Sin embargo, esta sal posee un sabor astringente que modifica las características sensoriales de los productos y puede llegar a generar vómitos y/o náuseas (Salgueiro y col., 2000; Solomons y col., 2011; WHO, 2007). Además, tiende a apelmazarse dificultando su manipuleo. Por lo tanto, se requiere la aplicación de estrategias, como la encapsulación, que permitan superar algunas de estas limitaciones.

Según el Código Alimentario Argentino (CAA, Capítulo XVII, Artículo 1381) “Se definen como Suplementos Dietarios a los productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Siendo su administración por vía oral, deben presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulado, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras), y otras formas para absorción gastrointestinal, contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos”. De acuerdo con el CAA, los suplementos dietarios deberán proveer no menos del 20% de la IDR del nutriente.

Las tabletas comprimidas son consideradas actualmente las formas sólidas de dosificación unitaria más administradas por vía oral. Estas son obtenidas por compresión mecánica de formulaciones en polvo conteniendo uno o varios compuestos activos mezclados con excipientes (disgregantes, diluyentes, lubricantes, ligantes, entre otros) (Lee, 2007; Raymond y col., 2006).

En la Fig. 3.2 se ilustran las etapas involucradas durante el proceso de compactación de aglomerados y polvos (Jivraj y col., 2000; Nyström y col., 1993).

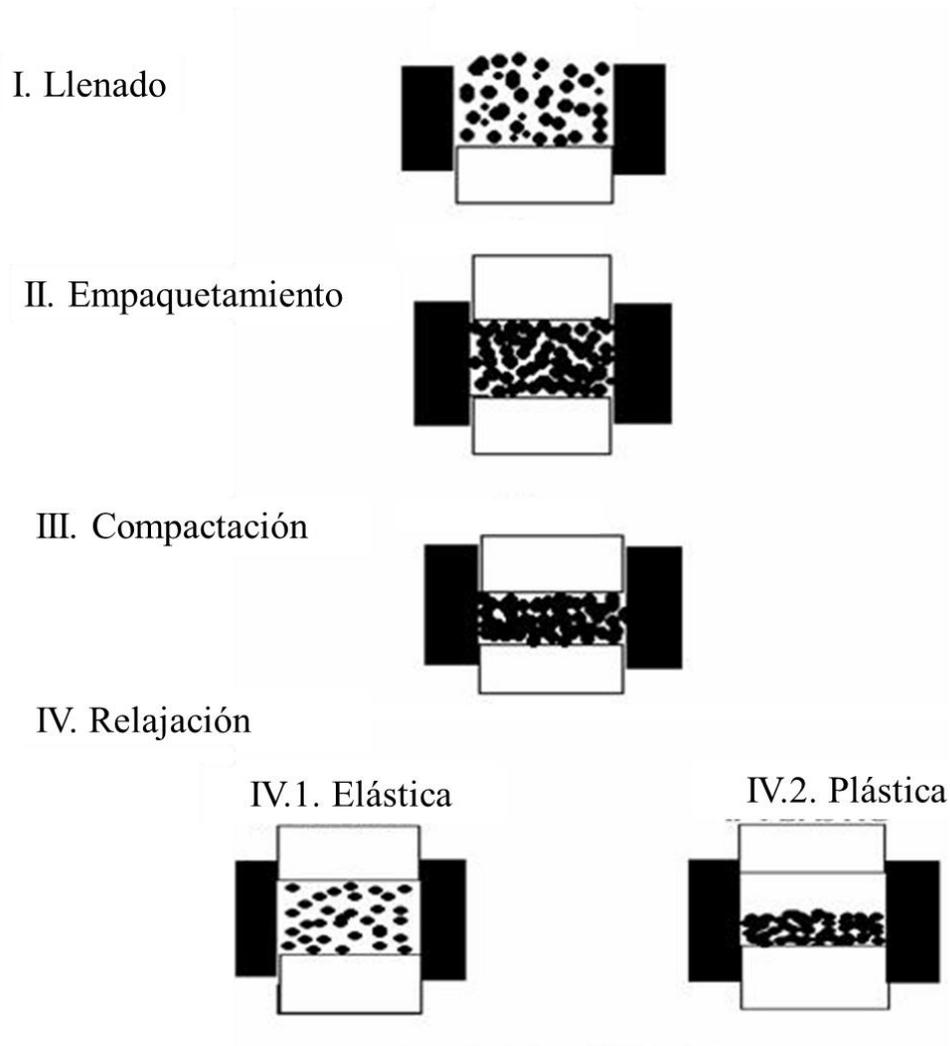


Figura 3.2. Etapas involucradas durante el proceso de compactación.

Inicialmente, las partículas se mueven en el interior de la cavidad de la matriz para ocupar los espacios vacíos que existen entre ellas, incrementándose la densidad aparente del material. Las partículas esféricas experimentan menos reordenamientos que las partículas de superficie más rugosa y de forma irregular. Luego, a una determinada presión, el nivel de empaquetamiento y la alta fuerza de fricción previenen el movimiento de las partículas, por lo que se produce la deformación elástica y plástica. Durante la deformación elástica el cambio de forma es reversible, por esta razón el material volverá a su forma original si desaparece la fuerza aplicada. Mientras que cuando se excede el límite elástico, se produce

la deformación plástica o la fragmentación. Pueden darse cualquiera de los dos mecanismos en función de las características intrínsecas del material, la velocidad y la presión de compactación y el tamaño de partícula. Finalmente, cuando la fuerza de compresión desaparece, el comprimido puede experimentar fenómenos de relajación (Nyström y col., 1993).

Durante la transformación de una mezcla en polvo en un comprimido se desarrollan un conjunto de fuerzas que permiten la unión entre las diferentes partículas que integran el comprimido. Estas uniones son las que determinan la resistencia mecánica de las tabletas. En general, los mecanismos de unión entre partículas han sido clasificados en cinco tipos: i) puentes sólidos, ii) fuerzas interfaciales con películas de líquido móvil dentro de los gránulos (fuerzas capilares y tensión superficial), iii) fuerzas de adhesión y cohesión con películas de líquido inmóvil entre partículas, iv) fuerzas de atracción entre partículas sólidas y v) entrelazamiento mecánico (Nyström y col., 1993).

Los comprimidos tienen importantes ventajas tales como: su mayor exactitud en la dosificación, menor volumen de administración, alta estabilidad, posibilidades de enmascarar sabores y olores desagradables, facilidad de transporte y almacenamiento. Además, las tabletas son generalmente más estables que las formulaciones líquidas y semisólidas, debido a que tienen baja humedad y actividad acuosa (Jivraj y col., 2000).

El método de fabricación preferido es la compresión directa debido a que es fácil, rápido y económico (Jivraj y col., 2000). En este proceso sólo se requieren operaciones de mezclado, lubricación y compactación. Sin embargo, muchos materiales no pueden ser procesados por esta técnica debido a su alta pegajosidad, mala fluidez y baja compactibilidad (ej. extractos naturales liofilizados) (Adiba y col., 2011; Zea y col., 2013). Por lo que en la mayoría de los casos es necesaria una etapa previa de granulación por vía húmeda o seca.

La co-cristalización en matrices de sacarosa es una técnica de encapsulación que permite proteger el compuesto activo de agentes externos (luz, humedad, oxígeno, entre otros) y enmascarar sabores desagradables. Esta técnica constituye una buena alternativa para la obtención de materiales porosos con excelentes propiedades de compactibilidad y muy buena fluidez (Awad y Chen, 1993; Bhandari y Hartel, 2002).

Los objetivos de este capítulo fueron desarrollar tabletas comprimidas con zinc empleando polvos obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa y evaluar sus características fisicoquímicas y sensoriales.

## **Materiales y métodos**

### **1. Preparación de los polvos con zinc mediante co-cristalización en matrices de sacarosa**

Para la preparación de los polvos se empleó sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Parafarm, Argentina) como fuente de mineral (4.4 mg de  $\text{ZnSO}_4$  proporcionan 1 mg de Zn) y sacarosa comercial como agente encapsulante. Los productos se prepararon en forma similar a la descrita en el Capítulo 2 para los polvos con antioxidantes de yerba mate.

Se prepararon mezclas de sacarosa comercial (100 g), sulfato de zinc (7.0 g) y agua destilada (20 mL). Las mezclas fueron calentadas a dos temperaturas distintas (80°C y 132°C), usando una placa calefactora. Esta etapa se realizó bajo agitación constante a 500 rpm, empleando un agitador vertical con paleta tipo ancla. Además, se monitoreó la temperatura de la mezcla y la concentración de sólidos solubles. Una vez alcanzada la temperatura final, las mezclas se mantuvieron a las mismas condiciones hasta alcanzar la sobresaturación. Luego se retiraron de la placa calefactora y se enfriaron a temperatura ambiente bajo agitación a 700 rpm.

Los productos obtenidos se sometieron a secado a 40°C en una estufa de convección forzada (SanJor, Argentina) hasta peso constante (alrededor de 15 h) y luego se molieron y se pasaron a través de una malla de 500  $\mu\text{m}$ . Finalmente, los polvos se colocaron en bolsas plásticas y se almacenaron en desecadores con sílica gel hasta su análisis. Se prepararon muestras sin compuesto activo, siguiendo el mismo protocolo, a fin de ser empleadas como control.

### **2. Determinación del contenido de compuesto activo**

El contenido de zinc se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica, usando un equipo marca Varian modelo EspectrAA 300-plus (Cambridge, Reino Unido). Previo al análisis, las muestras se sometieron a digestión con ácido nítrico concentrado a ebullición.

El material digerido se filtró y se llevó a volumen con agua Milli-Q.

La capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación de compuesto activo fueron calculadas como se indicó en el capítulo anterior.

### **3. Caracterización de los polvos con zinc**

La preparación de las muestras y las condiciones en las que se realizaron los ensayos fueron similares a las descritas en el Capítulo 2. El contenido de humedad (%) fue determinado mediante el método gravimétrico (AOAC, 1998). La actividad acuosa fue medida usando un equipo Aqualab (AOAC, 1998). El análisis morfológico fue realizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la distribución del mineral sobre la superficie de los productos a través de microanálisis de energía dispersiva de rayos-X (EDX). Los polvos fueron analizados mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X.

La fluidez fue evaluada a través del ángulo dinámico de reposo y los índices de Hausner y Carr (USP 30-NF 25, 2007). La cinética de ganancia de agua y la higroscopicidad fue determinada mediante exposición de los productos a atmosfera de 75%HR a 20°C. Los polvos fueron pesados a diferentes tiempos hasta que alcanzaron una masa constante. El contenido de humedad en base seca se calculó mediante la ecuación de Jaya y Das (2004), presentada en el Capítulo 2. La higroscopicidad (HG%) fue expresada como la masa de agua adsorbida en el equilibrio por cada 100 gramos de muestra seca (Newman y col., 2008). Los polvos fueron mantenidos a las mismas condiciones durante 30 días y luego fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar posibles cambios en su morfología.

### **4. Ensayo de compactibilidad de los polvos con zinc**

Los polvos con zinc, adicionados de estearato de magnesio (1g/100 g polvo), fueron compactados usando una prensa hidráulica con manómetro (Delfabro, Argentina) a diferentes fuerzas de compresión (4.9, 9.8, 14.7 y 19.6 kN) durante 5 s (Fig. 3.3a). Se utilizaron matrices y punzones planos de 10 mm de diámetro. La dureza de cada comprimido fue determinada como el promedio de 6 mediciones utilizando un durómetro táctil (Scout, Argentina) (Fig. 3.3b).

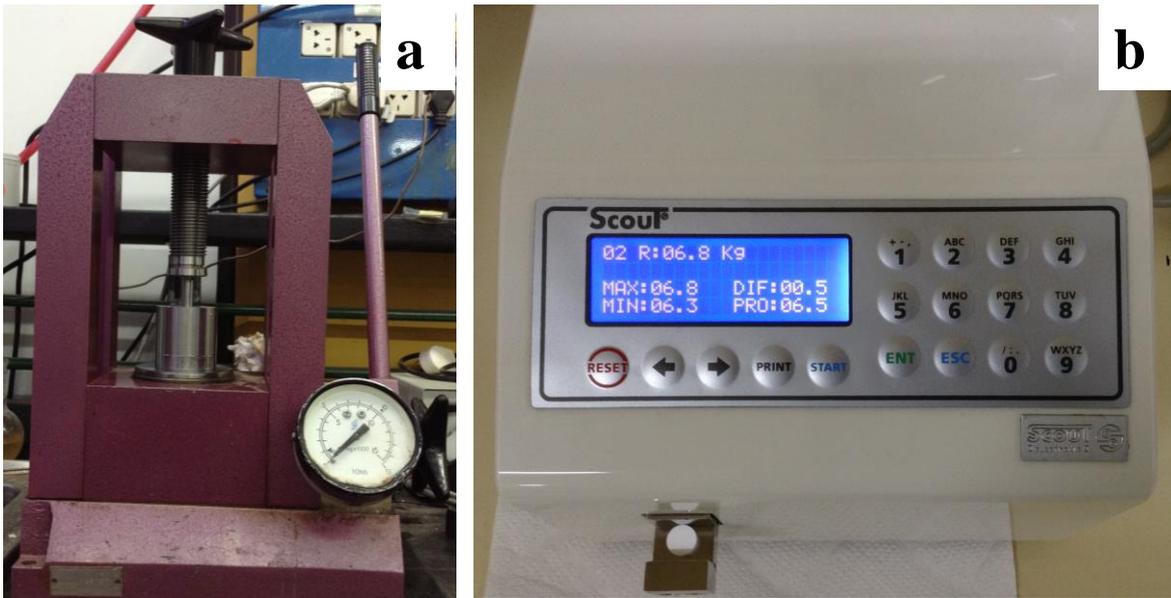


Figura 3.3. Prensa hidráulica (a) y durómetro digital (b) empleados para la obtención de las curvas de compactabilidad

## 5. Formulación de los comprimidos

Se prepararon formulaciones a base de polvos con zinc obtenidos por co-cristalización con sacarosa. La concentración de mineral fue ajustada, usando como diluyente almidón de maíz nativo (Unilever, España), para alcanzar una concentración de zinc por tableta equivalente al 40% de la ingesta diaria recomendada para un adulto (WHO y FAO, 2004). Se prepararon mezclas de polvo con zinc (80 g/100 g mezcla) y almidón de maíz (20 g/100 g de mezcla). Las formulaciones fueron adicionadas de estearato de magnesio (Bagó, Argentina), un lubricante, para evitar la adhesión del polvo a la matriz y/o punzones de la compresora (1g/100g de mezcla). Para facilitar la homogeneidad y evitar la segregación de las mezclas, todos los ingredientes fueron pasados a través de una malla de 500  $\mu\text{m}$  antes de su uso. Previo a la compresión, se determinó el contenido de humedad (AOAC, 1998) y la fluidez de las mezclas (ángulo de reposo e índices de Hausner y de Carr) (USP 30-NF 25, 2007).

## 6. Preparación de los comprimidos

Las formulaciones en polvo fueron directamente comprimidas usando una compresora mono-punzón (Modelo SC1, Sánchez, Argentina) de pequeña escala (6.000 comprimidos/hora). Esta máquina fue ajustada previamente para obtener tabletas de alrededor de 350 mg y de diámetro constante (9 mm).

La máquina compresora consta de: una *tolva de alimentación* por la que se introducen las formulaciones, *los punzones superior e inferior* encargados de aplicar la fuerza de compresión y *la matriz* por la que se desplazan los punzones durante la formación del comprimido (Fig. 3.4).



Figura 3.4. Imágenes de (a) máquina compresora mono-punzón, (b) matriz y punzones superior e inferior y (c) tabletas comprimidas.

## 7. Caracterización de los comprimidos

Las principales características físicas de las tabletas fueron determinadas mediante los métodos recomendados por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007).

### 7.1. Uniformidad en peso

La uniformidad en el peso fue evaluada mediante el pesaje de 10 tabletas elegidas aleatoriamente.

### 7.2. Diámetro, espesor y densidad

El espesor fue medido usando un calibre (Vernier) y la densidad fue calculada dividiendo la masa sobre el volumen de cada tableta.

### *7.3. Dureza*

La dureza de los comprimidos fue determinada empleando un equipo Erkewa (Alemania). Los resultados fueron expresados como el promedio de 6 determinaciones.

### *7.4. Contenido de compuesto activo*

El contenido de zinc fue determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica como se describió anteriormente.

### *7.5. Tiempo de desintegración in vitro*

Se determinó el tiempo de desintegración en agua a 37°C empleando un equipo Erkewa (Alemania). Se analizaron 6 tabletas de cada formulación. El tiempo de desintegración se definió como el tiempo necesario para la desintegración completa de los comprimidos, determinado por observación visual.

### *7.6. Tiempo de desintegración in vivo y aceptabilidad sensorial*

El tiempo requerido para la desintegración oral y la aceptabilidad sensorial fueron evaluados por 10 jueces no entrenados (6 hombres y 4 mujeres) con edades comprendidas entre 28 y 35 años. Los voluntarios recibieron instrucciones de no mover sus lenguas durante la prueba. El tiempo de desintegración fue indicado por los jueces cuando no percibían grumos en la lengua. El residuo se mantuvo en la boca durante otros 30 s, y luego se escupió. Se proporcionó agua potable para el enjuague de la boca entre muestras. Finalmente, se evaluaron los atributos de apariencia, sabor, textura y aceptabilidad general usando una escala hedónica de 9 puntos (1 = “me disgusta mucho”; 5= ni me gusta, ni me disgusta; 9 =“me gusta mucho”). Para este ensayo, también se prepararon tabletas empleando una mezcla física de sulfato de zinc, sacarosa y almidón de maíz y éstas fueron evaluadas sensorialmente para comparación.

## **Resultados y discusión**

### **1. Efecto de la temperatura y el grado de sobresaturación sobre el proceso de co-cristalización de zinc en matrices de sacarosa**

Se evaluaron temperaturas de calentamiento de 80 y 132°C para la obtención de los polvos con zinc mediante co-cristalización en matrices de sacarosa. No fue posible la obtención de productos con zinc a la temperatura de 132°C debido a que se produjo la descomposición de la sal observándose cambios de coloración, pasando de color blanco a marrón oscuro.

A 80°C, se obtuvieron mayores velocidades de calentamiento para las mezclas con zinc (3.14°C/min) que para las formulaciones control (2.3°C/min). Bajo estas condiciones, se alcanzaron grados de sobresaturación (S) de alrededor de 1.1. En forma similar a lo observado en la obtención de los polvos con extracto de yerba mate (Capítulo 2), en estos ensayos la sacarosa no se disolvió completamente a lo largo del proceso quedando cristales remanentes. Éstos probablemente actuaron como semilla para la nucleación desde la solución sobresaturada (Beristain y col., 1996; Hartel y Shastry, 1991).

Se obtuvieron aglomerados con humedad remanente los cuales fueron sometidos a secado hasta obtener valores de contenido de humedad y actividad acuosa de 2% y 0.6, respectivamente. Estas características son consideradas favorables para evitar el deterioro microbiano (Fu y Labuza, 1993).

### **2. Contenido de zinc de los polvos y eficiencia de encapsulación**

Los polvos con zinc mostraron un contenido de compuesto activo de alrededor de 17 mg Zn/g de polvo. Teniendo en cuenta la ingesta diaria recomendada (IDR) para un adulto establecida por WHO y FAO (2004), 11 mg para hombres y 8 mg para mujeres (Tabla 3.1), estos productos constituyen una alternativa útil para suplir las necesidades de minerales de la población vulnerable. Por su alta dosis de zinc, los productos pueden diluirse previo al consumo mediante mezcla con otros ingredientes para preparación de mezclas en polvo por ejemplo de postres, gelatinas, entre otros.

Se obtuvieron eficiencias de encapsulación de Zn de alrededor de 98%, lo que indica que durante el proceso de co-cristalización no se produjeron pérdidas del compuesto activo por efecto del calentamiento. Deladino y col. (2007a) han informado rendimientos de 97 y 100% en la obtención de productos con magnesio y calcio, respectivamente.

### 3. Análisis morfológico

En la Fig. 3.5 se observan las micrografías SEM de los polvos con zinc obtenidos por co-cristalización con sacarosa y la distribución de zinc y azufre sobre los materiales, detectada mediante microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX).

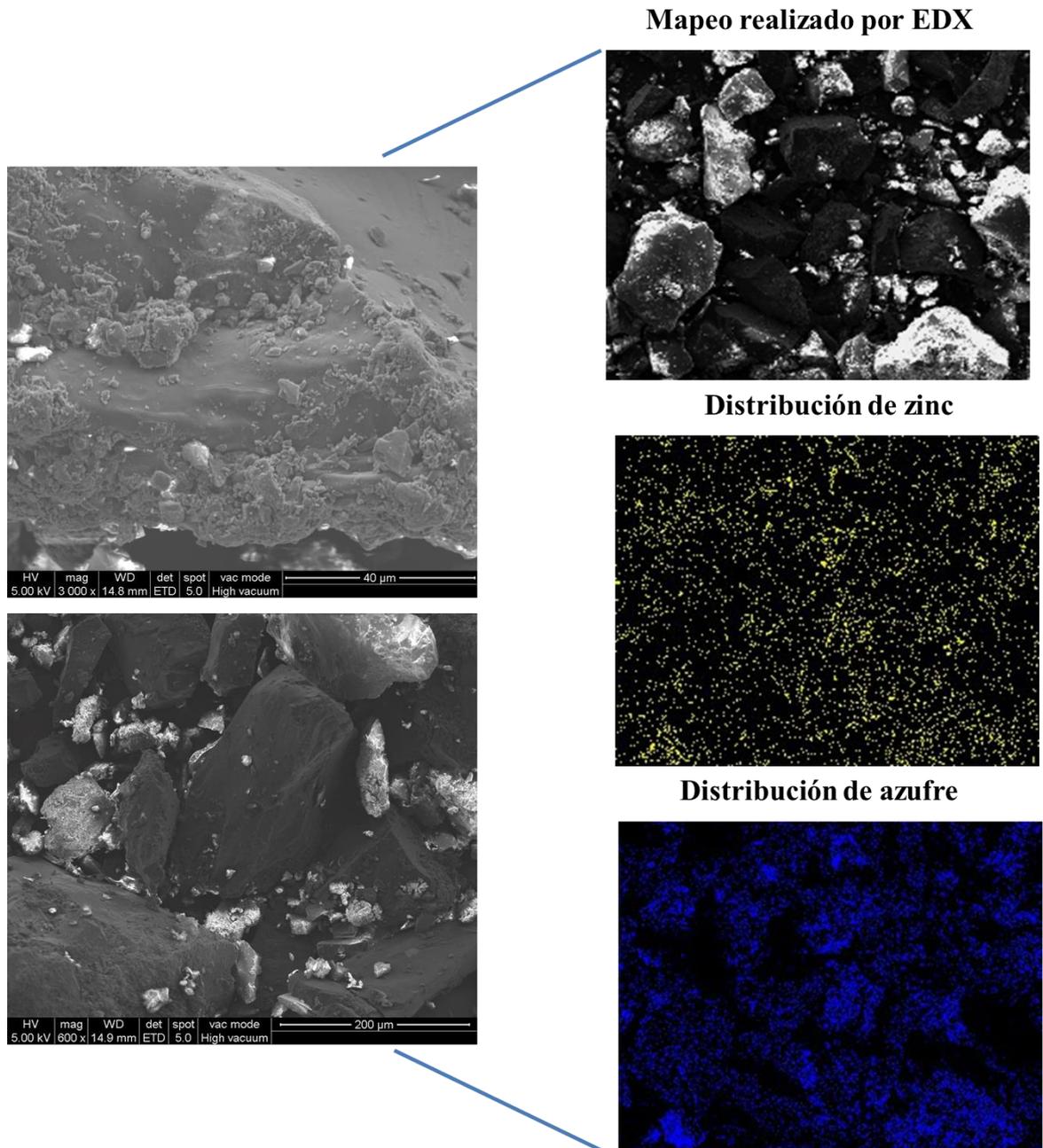


Figura 3.5. Micrografías SEM de los polvos con zinc y mapeo superficial de la distribución de zinc y azufre sobre los materiales.

Se observaron cristales aglomerados con una distribución homogénea de zinc sobre la superficie. En estos productos, la distribución de azufre no fue uniforme, encontrando algunas zonas con mayores concentraciones de este elemento. Lo anterior indica, que debido a las altas dosis de Zn empleadas para la preparación de los polvos, una fracción de mineral es atrapada entre los aglomerados mientras que otra se adsorbe sobre la superficie de ellos.

#### 4. Estabilidad térmica

En la Fig. 3.6 se muestran los termogramas DSC obtenidos para el sulfato de zinc, los aglomerados control y los polvos con zinc obtenidos por co-cristalización con sacarosa.

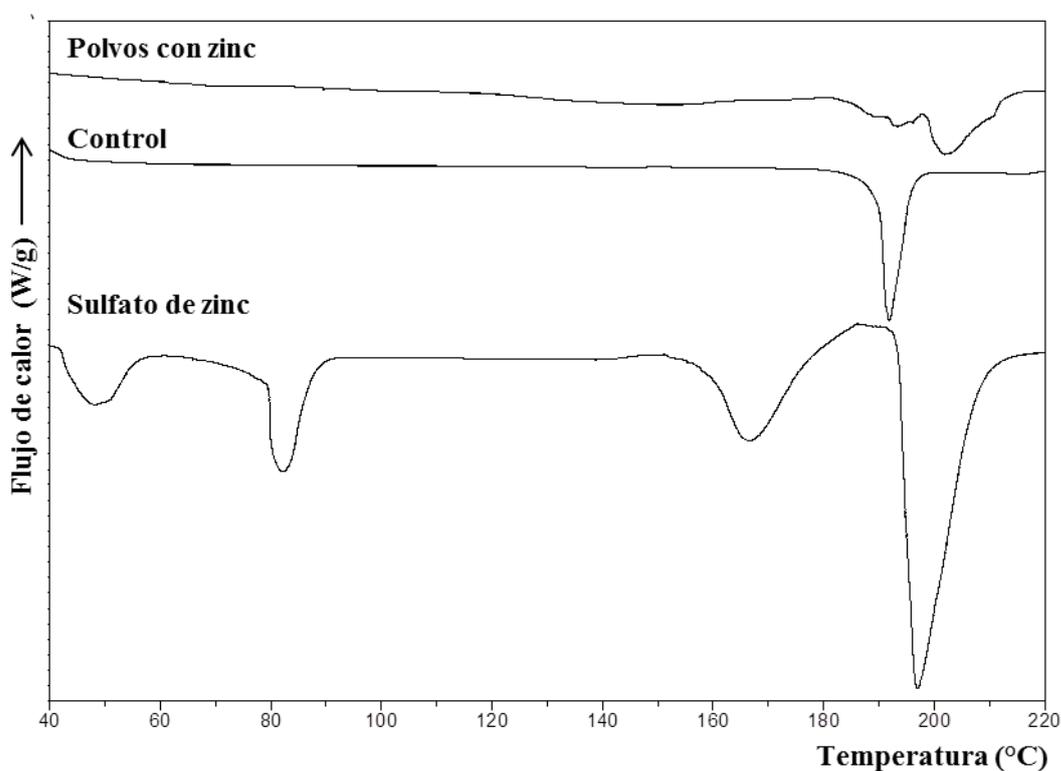


Figura 3.6. Termogramas DSC de sulfato zinc, aglomerados control y polvos con zinc obtenidos por co-cristalización con sacarosa.

El sulfato de zinc presentó endotermas alrededor de 48, 82, 167 y 197°C. En el termograma de los productos con zinc se observó una endoterma alrededor de 201°C, ésta fue ancha debido a la superposición de las bandas ubicadas a 192 y 197°C correspondientes a los aglomerados control y el sulfato de zinc, respectivamente (Fig. 3.6).

En los polvos con zinc, no se detectaron las demás endotermas halladas en el termograma del  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , probablemente debido a la deshidratación de la sal durante el proceso de co-cristalización. Se obtuvieron valores de entalpía de fusión de  $121.9 \pm 4.6 \text{ J/g}$  para la endoterma ubicada a  $192^\circ\text{C}$  en la muestra control y de  $165 \pm 6.5 \text{ J/g}$  para la transición detectada a  $197^\circ\text{C}$  en los polvos con zinc. El aumento en el valor de  $\Delta H$  en estos últimos materiales fue atribuido a la presencia del mineral.

### 5. Análisis de interacciones mediante FTIR

En la Fig. 3.7 se observan los espectros IR obtenidos para el sulfato de zinc, los productos con zinc y los aglomerados control. El espectro del sulfato de zinc mostró señales a  $624, 751, 880, 987, 1121, 1620, 2065 \text{ cm}^{-1}$ . Bandas ubicadas a  $611$  y  $981 \text{ cm}^{-1}$  fueron asignadas a modos de vibración de los grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  por Saha y Podder (2011).

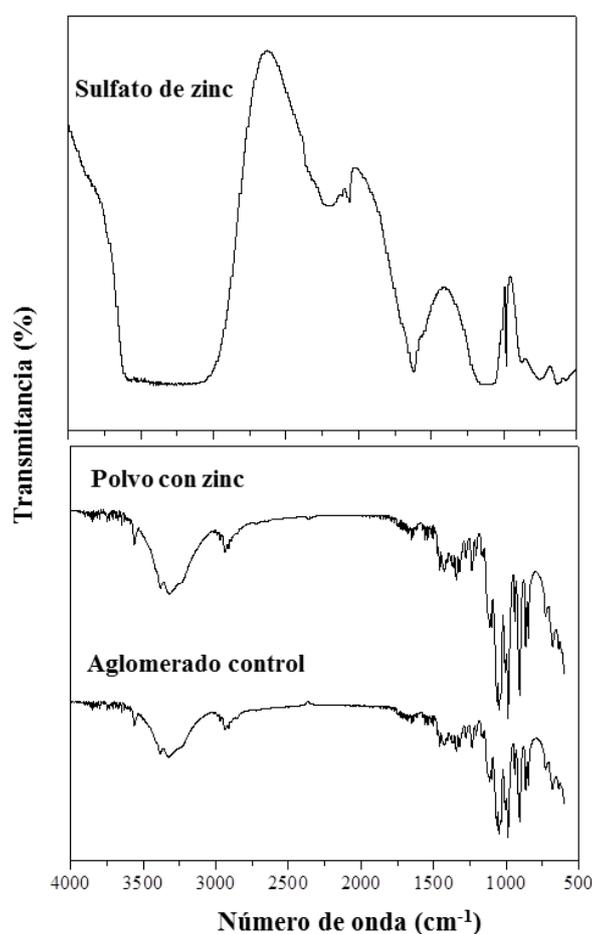


Figura 3.7. Espectros IR del sulfato de zinc, los productos con zinc y los aglomerados control.

Los polvos con zinc mostraron espectros similares a la muestra control, indicando que no ocurrieron cambios conformacionales importantes en la sacarosa, ni interacciones entre la matriz encapsulante y el compuesto activo (Brizuela y col., 2012; Gopi y col., 2013). En estos polvos no se detectaron señales correspondientes al sulfato de zinc probablemente debido a la baja concentración de esta sal en relación a la masa de sacarosa.

## 6. Propiedades de flujo

La Tabla 3.2 muestra las propiedades de flujo del sulfato de zinc, las muestras control y los productos con zinc. Se observa que todas las muestras presentaron ángulos de reposo e índices Hausner característicos de materiales de fluidez aceptable (USP 30-NF 25, 2007).

Tabla 3.2. Propiedades de flujo del sulfato de zinc, las muestras control y los polvos con zinc.

Muestra	Angulo de reposo (°)	Índice Hausner
Sulfato de zinc	49.1 ± 4.2	1.1 ± 0.1
Muestra control	41.8 ± 4.7	1.0 ± 0.1
Polvos con zinc	47.1 ± 5.9	1.2 ± 0.1

En la Fig. 3.8 se presentan los índices de Carr (IC) obtenidos para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con zinc.

Los productos con zinc mostraron valores de IC similares a los del  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , indicando que la fluidez del compuesto activo no fue afectada por el proceso. Si bien el valor de IC hallado para los polvos con zinc fue mayor que para los aglomerados control (Fig. 3.8), dicho índice es más bajo que los informados en excipientes como el almidón de maíz, IC=26% (Raymond y col., 2006). Por lo tanto, los polvos con zinc obtenidos mediante co-cristalización con sacarosa se consideran como productos con buenas propiedades de flujo y compresibilidad.

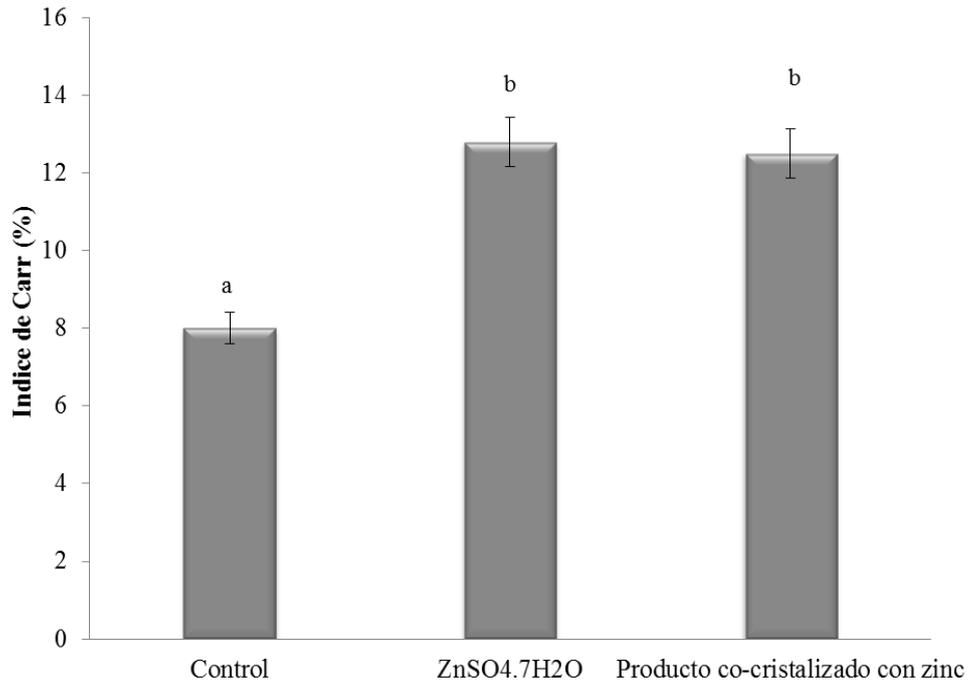


Figura 3.8. Índices de Carr (IC) obtenidos para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con Zn. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 7. Patrones de difracción de rayos X

En la Fig. 3.9 se muestran los patrones de difracción de rayos X obtenidos para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con zinc. El sulfato de zinc presentó picos característicos a  $2\theta = 16.7$  y  $21.1^\circ$  (Saha y Podder, 2011).

Los difractogramas de los aglomerados control y los polvos con zinc mostraron un patrón de difracción similar al de la sacarosa con picos a  $2\theta = 11.7, 12.7, 18.8, 19.6, 24.8, 25.2$  y  $38.3$  (JCPDS, 1999). Además en estas muestras se observan picos agudos bien definidos, indicando que, posteriormente al proceso de co-cristalización, la sacarosa se mantiene en estado cristalino.

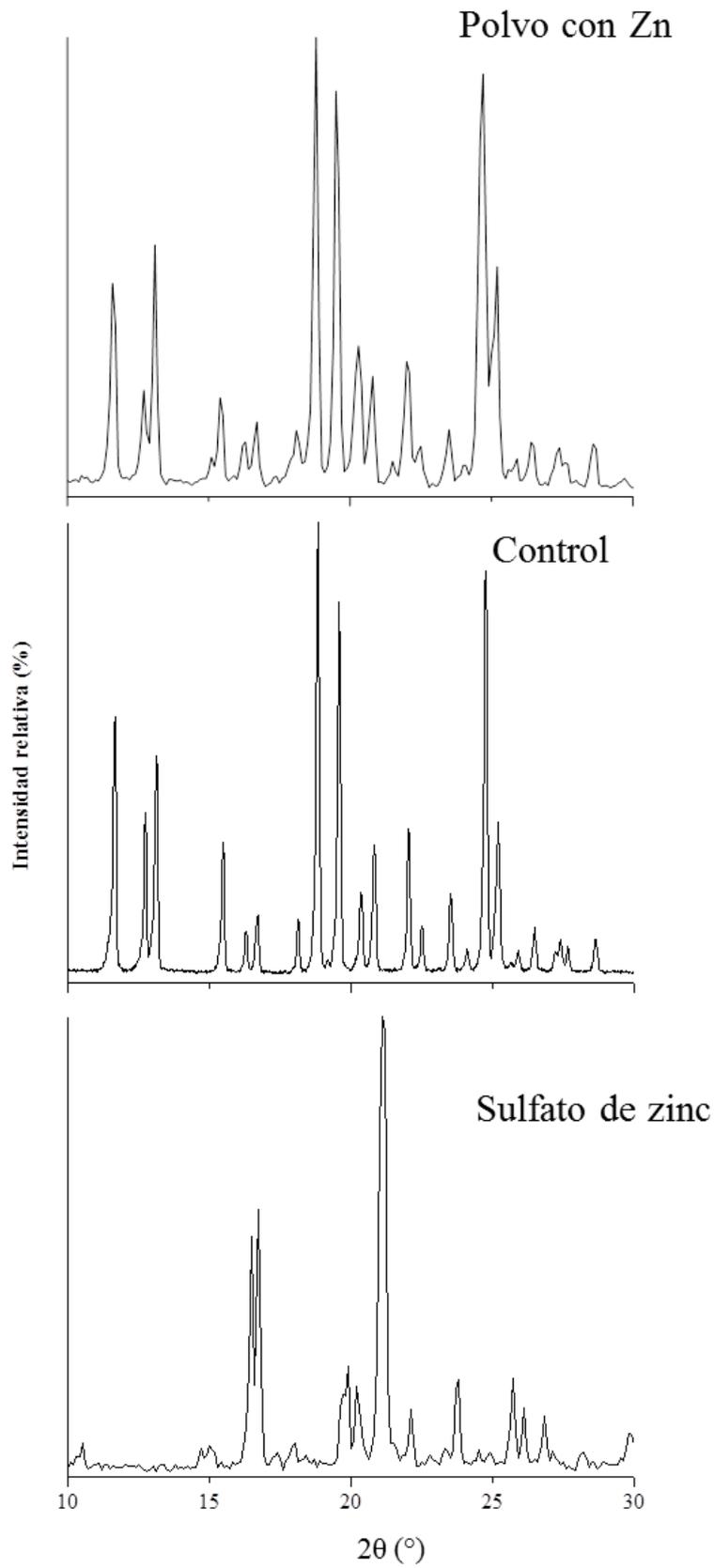


Figura 3.9. Patrones de difracción de rayos X del sulfato de zinc heptahidratado, los aglomerados control y los polvos con zinc.

### 8. Estabilidad de los polvos con zinc en el almacenamiento

En la Fig. 3.10 se muestra el comportamiento de la humedad en el tiempo, a 75% HR y 20°C, para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con zinc. Se observaron diferencias entre los perfiles de ganancia de agua de las muestras. El sulfato de zinc y la muestra control no mostraron cambios significativos en su contenido de humedad en el tiempo ( $p>0.05$ ); mientras que los polvos con zinc mostraron un incremento en su contenido de humedad de alrededor del 50%, con respecto al valor inicial. Este comportamiento fue atribuido a la deshidratación sufrida por la sal, por efecto de la temperatura durante el proceso de co-cristalización, que pudo haber aumentado su tendencia a ganar agua del ambiente.

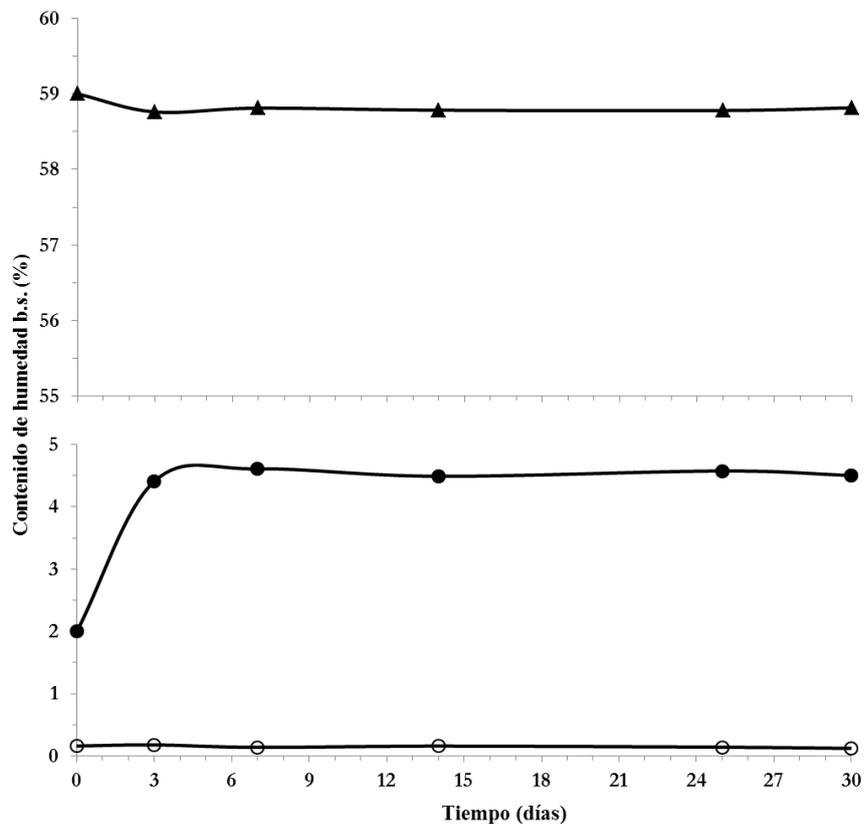


Figura 3.10. Comportamiento del contenido de humedad en el tiempo del sulfato de zinc (▲), la muestra control (○) y los productos con zinc (●) bajo condiciones de 75% HR y 20°C.

La higroscopicidad es considerada un factor determinante de las interacciones partícula-partícula y las propiedades de flujo de los materiales (Newman y col., 2008).

Se obtuvieron valores de higroscopicidad de 0.08, 0.014 y 2% para el sulfato de zinc, la muestra control y los polvos con zinc, respectivamente. Estos valores son característicos de productos poco higroscópicos, constituyendo una importante ventaja desde el punto de vista industrial por el bajo costo de los empaques.

Se analizaron los cambios en la morfología de los productos almacenados durante 30 días a condiciones de 75% HR y 20° C (Fig. 3.11).

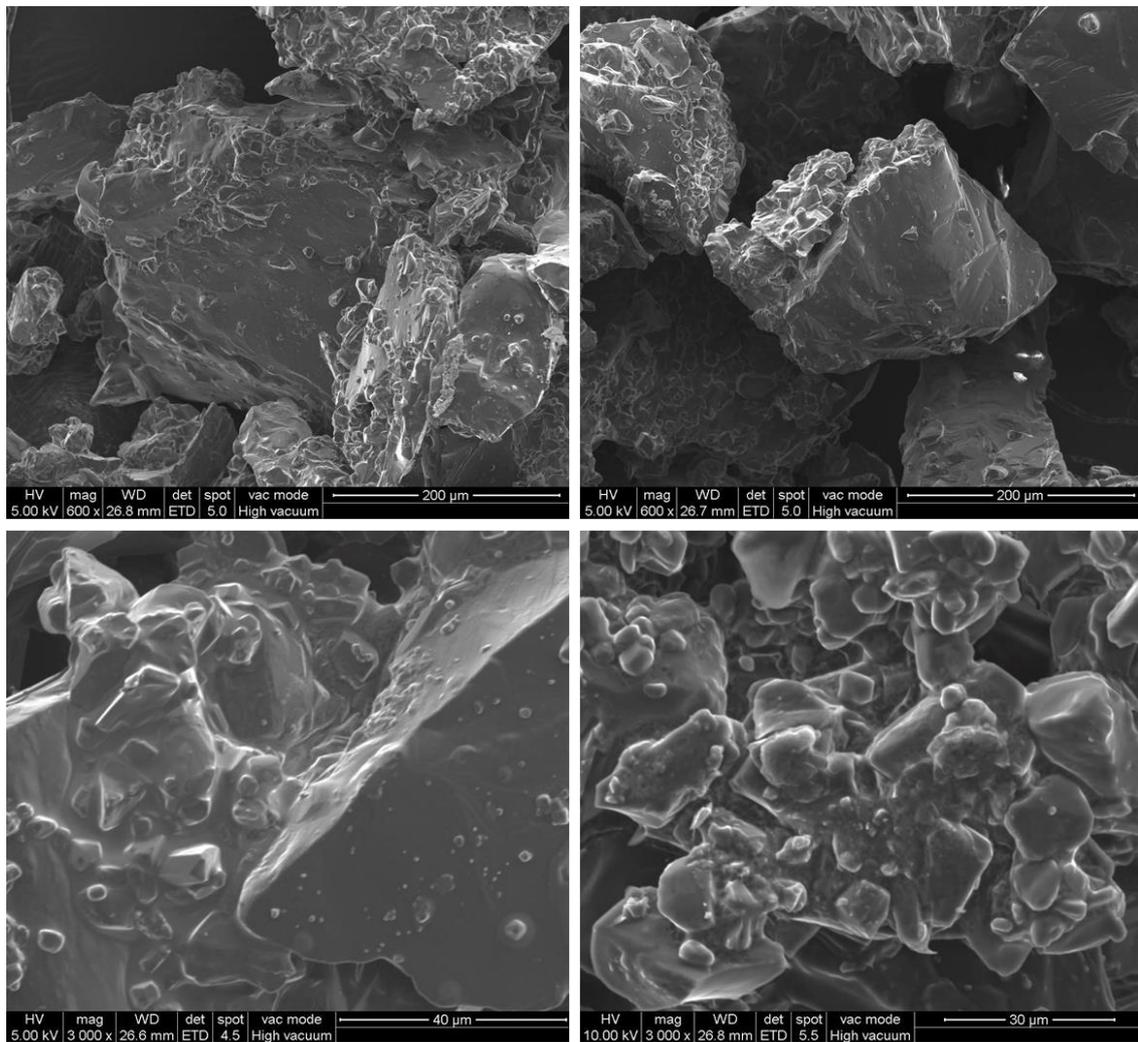


Figura 3.11. Micrografías SEM de los polvos con zinc almacenados durante 30 días a 75% HR y 20 °C.

Se observaron cristales sobre la superficie de los aglomerados almacenados. Estos fueron de mayor tamaño que los observados en los productos sin almacenar. Lo que podría indicar una posible re-cristalización del sulfato de zinc por el aumento del contenido de humedad de los productos durante el almacenamiento (Fig. 3.11).

### 9. Propiedades de compactibilidad

En la Fig. 3.12 se muestra la curva de compactibilidad de los polvos con zinc obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa. Estos productos mostraron muy buenas propiedades de compactación, permitiendo la formación de tabletas con valores óptimos de dureza, a bajas fuerzas de compresión (4.7 kN). A valores mayores que 14 kN, la dureza de los comprimidos alcanzó una meseta en la que no varió en función de la fuerza de compresión. Este comportamiento es característico de materiales que se deforman en forma plástica, generando mayor área de contacto y fuerzas entre partículas durante la compactación que se mantienen posteriormente a la relajación (Nyström y col., 1993).

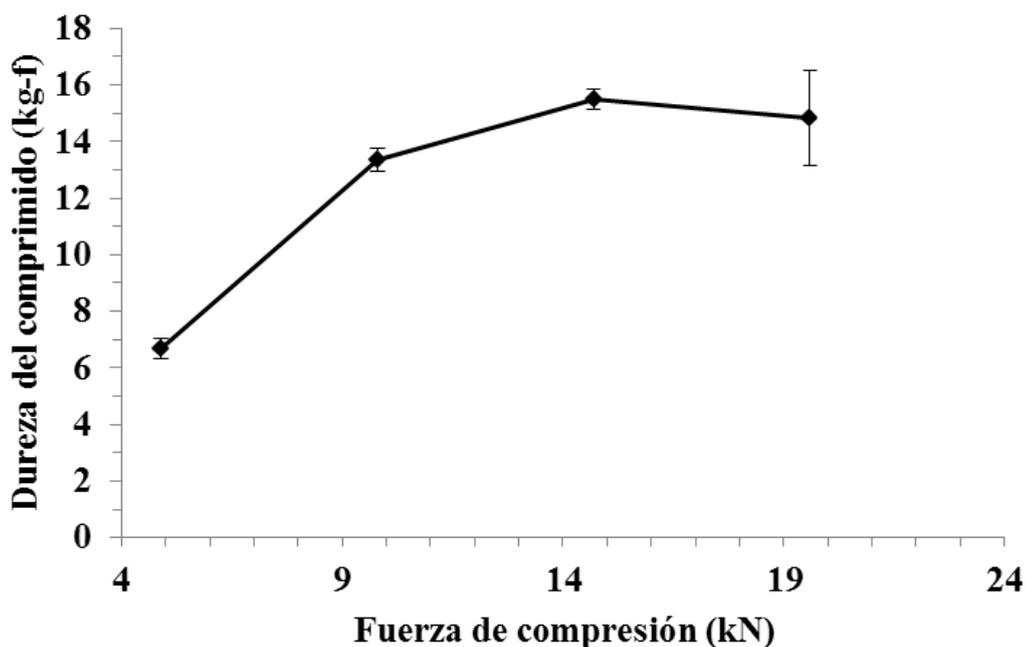


Figura 3.12. Curva de compactibilidad de los polvos con zinc. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que la línea representa el ajuste del modelo de Weibull (Ec. 3.1).

Según Castillo y Villafuerte (1995), los perfiles de compactibilidad con una forma sigmoidea pueden ser ajustados con la siguiente ecuación basada en la distribución de Weibull:

$$\ln\left(-\ln\left(1-\frac{D}{D_{\max}}\right)\right)=n\cdot\ln F_c+\beta \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde D es la dureza de las tabletas,  $D_{\max}$  es la dureza máxima alcanzada por las tabletas,  $F_c$  es la fuerza de compresión, n y  $\beta$  son la pendiente y la intercepción de la curva, respectivamente.

Los perfiles de compactibilidad de los polvos con zinc fueron ajustados al modelo de Weibull, obteniendo resultados satisfactorios ( $R^2_{\text{adj}}=0.998$ ). Este modelo ha sido utilizado para describir la compactibilidad de celulosas, como un indicativo de su funcionalidad como excipientes para tabletas (Castillo y Villafuerte, 1995; Sonnergaard, 2006).

#### **10. Propiedades de las formulaciones de las tabletas**

Las formulaciones de las tabletas mostraron contenidos de humedad de alrededor de 1.4%, los cuales son considerados favorables para su manipuleo y para prevenir el deterioro. En general, estas mezclas presentaron ángulos de reposo mayores de 50°. Sin embargo, se obtuvieron valores de IH entre 1.1-1.3 e IC entre 19-22%, que son característicos de mezclas con fluidez aceptable (USP 30-NF 25, 2007). Los cambios en esta propiedad, con respecto a los polvos con zinc sin agregado de diluyente, fueron atribuidos a la alta cohesividad del almidón de maíz (Jivraj y col., 2000).

#### **11. Propiedades fisicoquímicas de las tabletas**

Las propiedades físicas de los comprimidos con zinc se muestran en la Tabla 3.3. Las tabletas mostraron buena similitud en peso, lo que favorece la uniformidad en la dosis de compuesto activo.

Tabla 3.3. Propiedades físicas de los comprimidos con zinc

Parámetro	
Peso promedio (mg)	344 ± 12
Espesor (mm)	5.0 ± 0.2
Densidad ( g cm <sup>-3</sup> )	1.3 ± 0.2
Dureza (kg-f)	4.8 ± 0.2
Tiempo de desintegración <i>in vitro</i> (min)	4.6 ± 1.2
Tiempo de desintegración <i>in vivo</i> (min)	3.7 ± 1.6

Se obtuvieron valores de dureza característicos de tabletas con propiedades adecuadas para resistir el desgaste o ruptura durante su manipulación o procesamiento, particularmente durante el empaque (Lee, 2007). Los tiempos de desintegración *in vitro* e *in vivo* de los comprimidos fueron menores de 5 min (Tabla 3.3). Estos valores son considerados aceptables para formas de dosificación sólidas administradas por vía oral (Ando y col., 2007; Sugimoto y col., 2006).

Varios autores han demostrado que la dureza de los comprimidos es un factor importante para el tiempo de desintegración y el perfil de disolución (Adiba y col., 2011; Hosseini y col., 2013). En forma general, las tabletas con alta dureza tardan más en desintegrarse que las de baja dureza (Lee, 2007). En el presente trabajo fue posible obtener tabletas con valores de dureza apropiados que se desintegran rápidamente. Este comportamiento fue atribuido a la alta solubilidad de la sacarosa y el sulfato de zinc y también al efecto desintegrante del almidón (Raymond y col., 2006).

En la Fig. 3.13 se muestran las micrografías SEM de la superficie y de cortes transversales de los comprimidos con zinc. Se observó una matriz de alta densidad y con algunos poros. Además se encontraron gránulos de almidón distribuidos homogéneamente.

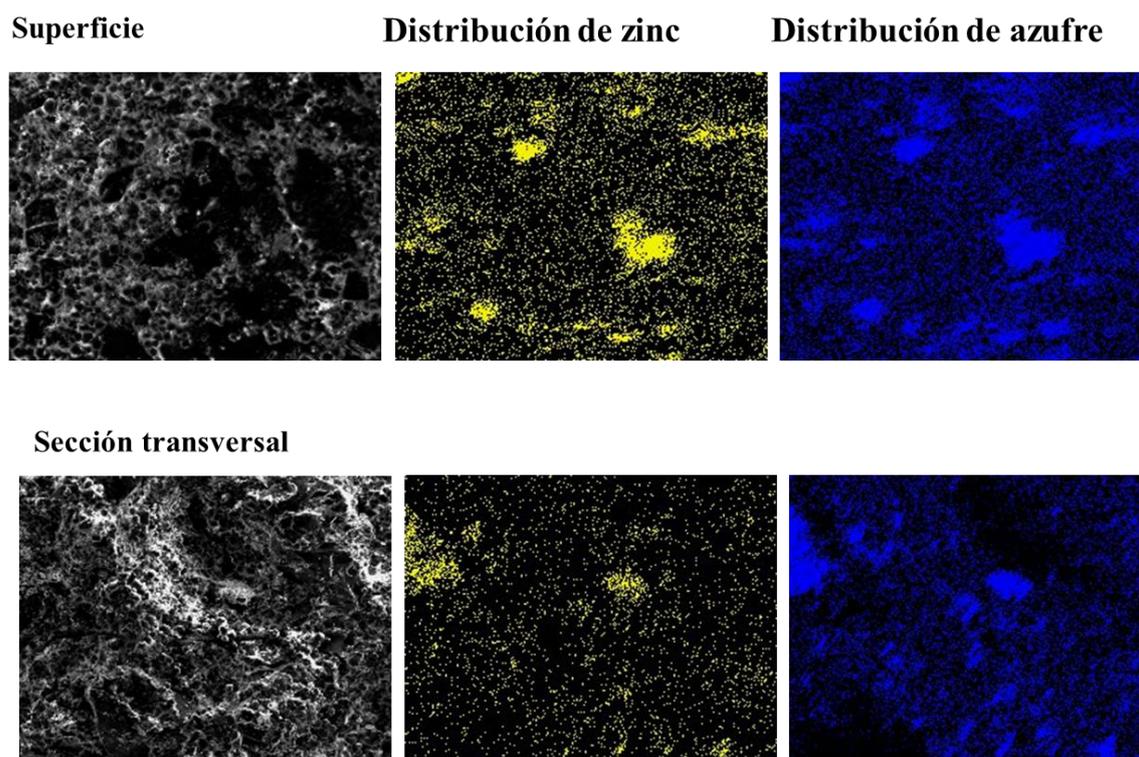


Figura 3.13. Micrografías SEM de los comprimidos con zinc y mapeo superficial de la distribución de zinc y azufre sobre los materiales.

Mediante el microanálisis EDX se observó una distribución uniforme de zinc y azufre en el exterior y en el interior de las tabletas. Sin embargo, se observaron algunas regiones con mayores concentraciones de ambos elementos, lo que puede ser debido a que el mezclado de las formulaciones se realizó en forma manual.

El contenido de zinc de las tabletas fue de  $4.5 \pm 0.5$  mg/comprimido, por lo que los productos cumplen con la definición establecida por el Código Alimentario Argentino para suplemento dietario, dado que 1 tableta aporta más del 40% de la ingesta diaria recomendada (IDR) de Zn (WHO y FAO, 2004).

## 12. Evaluación sensorial de las tabletas

En la Fig. 3.14 muestra los puntajes para cada atributo obtenidos para las tabletas comprimidas con zinc. Para mayor claridad de los resultados, la escala hedónica fue agrupada en tres intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

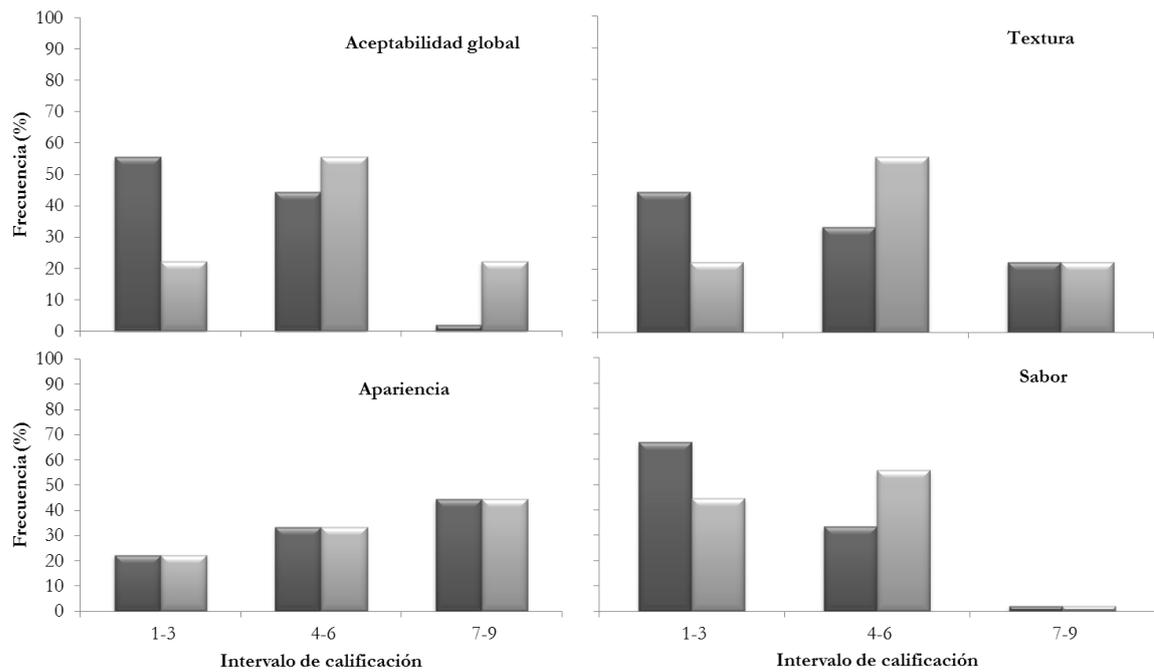


Figura 3.14. Atributos sensoriales de las tabletas comprimidas con zinc (barras grises) y de los comprimidos preparados con una mezcla física de los ingredientes (barras negras). Intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

Los comprimidos mostraron una aceptabilidad global promedio de 5 puntos, correspondiente a una posición neutra de la escala hedónica ("ni me gusta, ni me disgusta"). Esta calificación corresponde a un nivel de aceptación de los consumidores de alrededor del 55%. Mientras que las tabletas preparadas con la mezcla física de los ingredientes mostraron una aceptabilidad global promedio de 3 puntos, que corresponde a "me disgusta" en la escala hedónica.

Por otro lado, el 22% de los jueces evaluaron los comprimidos con polvos encapsulados con zinc con calificaciones entre 7 y 9, el 56% entre 4-6 y el 22% entre 1 y 3. Estos resultados son considerando muy satisfactorios teniendo en cuenta que los puntajes obtenidos corresponden al momento en que los comprimidos ya habían sido completamente desintegrados en la boca. En este sentido, el empleo de polvos con zinc, obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa, en preparaciones de comprimidos constituye una estrategia potencial para hacer más agradable al paladar el sabor astringente de las formas de dosificación de este mineral.

## **Conclusiones parciales**

1. Se obtuvieron polvos con alto contenido de zinc y una alta eficiencia de encapsulación.
2. La co-cristalización resultó ser una técnica efectiva para la preparación de aglomerados con buenas características de compresibilidad y fluidez.
3. Los productos mostraron valores de contenido de humedad y actividad acuosa característicos de buena estabilidad.
4. Se observó una distribución homogénea de iones zinc y sulfato sobre la superficie de los aglomerados.
5. Se desarrollaron tabletas comprimidas con un alto contenido de zinc.
6. Los sistemas desarrollados para vehiculización de zinc (povos y tabletas) constituyen una estrategia efectiva para suplir los requerimientos de la población en riesgo.

## **Capítulo 4. SISTEMAS DE CO-VEHICULIZACIÓN DE ZINC Y EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE**

### **Introducción**

Los efectos del consumo combinado de antioxidantes y minerales han sido estudiados por varios autores, encontrando que este tipo de compuestos actúan a favor del sistema de defensa humano no sólo de forma individual, sino también sinérgica y cooperativa (Amasheh y col., 2009; Carochó y Ferreira, 2013; Hercberg y col., 2004; Jacobs y col., 2009). En este sentido, el zinc y el extracto de yerba mate tienen grandes ventajas dado a que ambos poseen propiedades antioxidantes bajo diferentes mecanismos de acción (Gugliucci, 1996; Powell, 2000). Además, cada compuesto posee una gran variedad de propiedades biológicas, algunas de las cuales fueron mencionadas en los capítulos anteriores.

La vehiculización de dos o más compuestos activos con acción complementaria en una misma matriz (comprimido, cápsula o polvo) es una estrategia comúnmente empleada por la industria farmacéutica. Esta metodología tiene importantes ventajas, con respecto a la dosificación individual, dado que favorece el efecto sinérgico de los compuestos activos, reduce la frecuencia de dosificación y a su vez los efectos secundarios (Wang y col., 2011; Zhang y col., 2007). Sin embargo, se requiere la evaluación de posibles incompatibilidades entre los compuestos activos, que puedan afectar su funcionalidad biológica o química.

Varios estudios han informado acerca de las interacciones entre los polifenoles y otros compuestos tales como fibras y proteínas (Arts y col., 2001; Papadopoulou y Frazier, 2004; Saura-Calixto, 2010). Este tipo de interacciones puede darse principalmente por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes (Saura-Calixto, 2010). Por otro lado, se ha encontrado que algunos compuestos fenólicos, como los flavonoides, pueden formar complejos con el hierro y el cobre (Brown y col., 1998; De Souza y De Giovanni, 2004; Kuo y col., 1998; Makris y Rossiter, 2000). Sin embargo, pocos estudios han sido reportados acerca de reacciones entre el zinc y los compuestos fenólicos (De Souza y De Giovanni, 2005). Los objetivos de este capítulo fueron desarrollar sistemas para co-vehiculización de zinc y extracto de yerba mate (polvos y tabletas), evaluar el efecto del proceso de co-cristalización sobre los compuestos activos y analizar las propiedades fisicoquímicas de los productos obtenidos.

## **Materiales y métodos**

### **1. Preparación de polvos con zinc y extracto de yerba mate mediante co-cristalización en matrices de sacarosa**

Los polvos con zinc y extracto de yerba mate fueron obtenidos usando el mismo protocolo descrito para la preparación de los productos con cada compuesto activo individual (Capítulos 2 y 3). Se prepararon mezclas de sacarosa comercial (100 g), sulfato de zinc (7.0 g) y extracto de yerba mate (20 mL). Estas mezclas fueron concentradas por calentamiento a 80°C y luego enfriadas rápidamente manteniendo la agitación. Los polvos obtenidos se secaron a 40°C por 15 h, luego se molieron y se pasaron a través de una malla de 500 µm. Finalmente, los polvos se colocaron en bolsas plásticas y se almacenaron en desecadores con sílica gel hasta su análisis.

### **2. Caracterización de los polvos con zinc y extracto de yerba mate**

La preparación de las muestras y las condiciones en las que se realizaron los ensayos de caracterización fueron similares a las descritas en los capítulos anteriores. Se determinó el contenido de humedad (%) y la actividad acuosa de los polvos (AOAC, 1999).

El contenido de polifenoles totales fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu y los principales compuestos fenólicos y la cafeína mediante HPLC. La concentración de zinc se determinó por espectroscopía de absorción atómica. La eficiencia de encapsulación (%EE) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%EE = \left( \frac{L_c}{L_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde  $L_c$  es la masa encapsulada (g) de cada compuesto activo y  $L_0$  la cantidad (g) inicial adicionada a la formulación.

La actividad antioxidante fue determinada mediante el método del radical libre DPPH•. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición (%I).

Los polvos fueron también analizados mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de

rayos X. La fluidez fue evaluada mediante el ángulo dinámico de reposo y los índices de Hausner y Carr (USP 30-NF 25, 2007).

La estabilidad de los polvos fue analizada en términos de la cinética de ganancia de agua, la higroscopicidad y los cambios morfológicos de los productos a través de SEM y EDX. Previamente, todas las muestras fueron almacenadas a 75% HR y 20°C.

### **3. Formulación y preparación de los comprimidos**

Para la preparación de los comprimidos, los polvos con zinc y extracto de yerba mate (80g/100g de mezcla) fueron mezclados con almidón de maíz (20g/100g de mezcla), para diluir la dosis del mineral a concentraciones correspondientes al 40% de la ingesta diaria recomendada (WHO y FAO, 2004). Las formulaciones fueron adicionadas con estearato de magnesio (1g/100g de mezcla) para evitar la adhesión de las mezclas a la matriz y/o punzones de la compresora. Todos los ingredientes fueron pasados a través de una malla de 500 µm antes de su uso. Previo a la compresión, se determinó el contenido de humedad y la fluidez de las mezclas (USP 30-NF 25, 2007).

Finalmente, las formulaciones fueron comprimidas directamente utilizando la compresora mono-punzón descrita en el capítulo anterior. Se realizaron los ajustes necesarios para obtener comprimidos entre 410-460 mg y de diámetro constante (9 mm).

### **4. Caracterización de las tabletas**

Las principales características físicas de las tabletas fueron determinadas mediante los métodos recomendados por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007), descritos en el Capítulo 3. Se realizaron ensayos de uniformidad en peso, diámetro, espesor, densidad, dureza y tiempo de desintegración.

El contenido de compuestos fenólicos se determinó mediante los métodos de Folin-Ciocalteu y HPLC. La concentración de zinc fue determinada mediante espectroscopía de absorción atómica.

## Resultados y discusión

### 1. Eficiencia de encapsulación y contenido de compuestos activos de los polvos

Los productos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn) mostraron eficiencias de encapsulación de alrededor del 60% para ambos compuestos. Este valor es significativamente menor que el obtenido para cada compuesto co-cristalizado en forma individual: 85% para el extracto de yerba mate (CY10) y 98% para el zinc (CZn).

Los contenidos de compuestos activos de los productos fueron:  $1.3 \pm 0.3$  mg polifenoles/ g polvo y  $10.2 \pm 1.4$  mg Zn/ g polvo. La co-cristalización simultánea de zinc y extracto de yerba mate en matrices de sacarosa provocó una disminución del 37% del contenido de zinc y del 25% en el contenido de polifenoles respecto de CZn y CY10, respectivamente. Se observó un efecto similar sobre la capacidad antioxidante; los polvos CY10 mostraron una actividad inhibitoria frente al radical DPPH del 75%, mientras que los polvos CYZn mostraron un porcentaje de inhibición del 33%. Este valor corresponde a una disminución de la actividad anti-radical de alrededor del 56%, con respecto a CY10.

En la Fig. 4.1 se muestran los cromatogramas HPLC de los productos obtenidos por co-cristalización simultánea de zinc y extracto de yerba mate en matrices de sacarosa (CYZn).

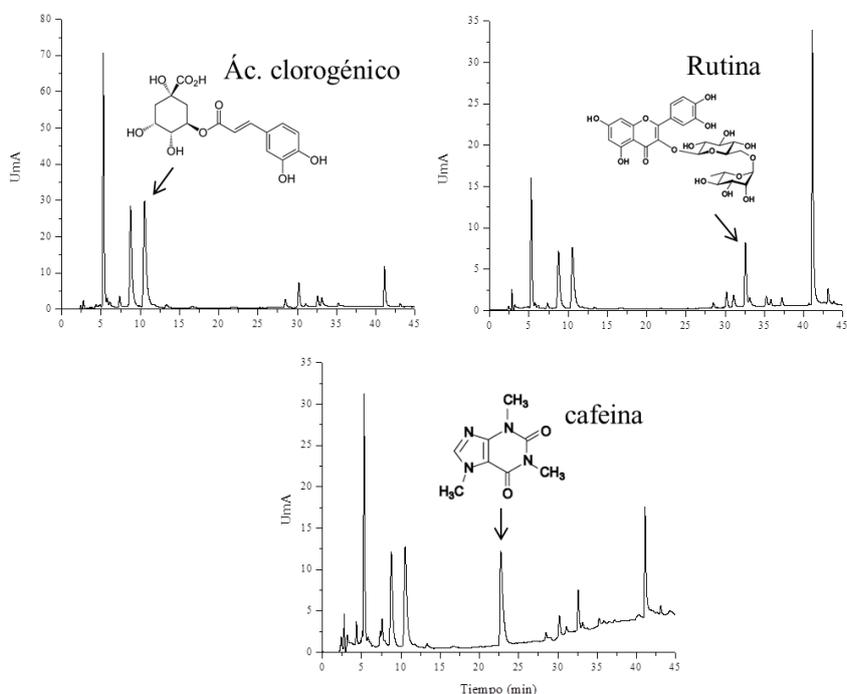


Figura 4.1. Cromatogramas HPLC de los polvos con zinc y extracto yerba mate (CYZn). Longitud de onda de detección: cafeína: 275 nm, ácido clorogénico: 330 nm y rutina: 360 nm.

En los productos CYZn se detectó la presencia de ácido clorogénico, rutina y cafeína, mediante la comparación de sus espectros DAD y los tiempos de retención con estándares puros. No se detectó la presencia de ácido cafeico probablemente por encontrarse su concentración por debajo del límite de detección del equipo. En la Tabla 4.1 se muestran las concentraciones de polifenoles y cafeína de los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn), determinadas por HPLC. Además se muestran las concentraciones de polifenoles de los productos CY10, presentadas anteriormente en el Capítulo 2, para comparación.

Tabla 4.1. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína, determinadas por HPLC, presentes en los polvos con extracto yerba mate (CY10) y con extracto y zinc (CYZn).

Compuesto Activo	Solución precursora mg/g polvo	CY10		CYZn	
		mg/ g polvo	Eficiencia (%)	mg/ g polvo	Eficiencia (%)
Ácido clorogénico	0.42 ± 0.004	0.26 ± 0.02	61.1	0.14 ± 0.007	32.4
Ácido cafeico	0.010 ± 0.001	0.013 ± 0.003	126.6	nd	Nd
Rutina	0.18 ± 0.01	0.07 ± 0.03	38.9	0.05 ± 0.007	26.7
Cafeína	0.35 ± 0.001	0.23 ± 0.01	66.2	0.10 ± 0.004	30.6

nd: no detectado

Los polvos CY10 mostraron un descenso en el contenido de ácido clorogénico, rutina y cafeína en relación a la cantidad adicionada a la formulación. En contraste, en estos productos se encontró una mayor cantidad de ácido cafeico que la inicial. Como se mencionó en el Capítulo 2, los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres formada por el ácido quínico y los ácidos trans-cinámicos, más comúnmente cafeico, p-cumárico y ácido ferúlico (Jaiswal y col., 2010). En este sentido, el incremento en la concentración de ácido cafeico puede ser atribuido a la degradación del ácido clorogénico y sus compuestos relacionados, generando sus ácidos constitutivos.

En el caso de los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn) se observó una mayor reducción en el contenido de ácido clorogénico, rutina y cafeína; y la presencia de ácido cafeico no fue detectada. Estas observaciones sugieren que la pérdida importante de la capacidad antioxidante de los productos CYZn pudo ser debida principalmente a la degradación parcial de los ácidos clorogénicos y sus derivados y a posibles interacciones entre el ácido cafeico y el zinc, dando a lugar a compuestos con actividad antioxidante

menor o nula. Makris y Rossiter (2000) estudiaron el efecto de la temperatura y la presencia de metales de transición ( $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ ) sobre la estabilidad química de flavonoides (rutina y quercetina). Estos autores encontraron que dichos compuestos son muy susceptibles a la degradación por temperatura en presencia de oxígeno y que además este efecto es más acelerado en presencia de metales de transición.

## 2. Contenido de humedad, actividad acuosa y análisis SEM de los polvos con zinc y extracto de yerba mate

Los productos mostraron valores de contenido de humedad de 0.6% y de actividad acuosa ( $a_w$ ) de 0.56. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para CY10 e inferiores a los de CZn. De acuerdo con Fu y Labuza (1993) y Fennema y Tannenbaum (1996), en los alimentos con  $a_w$  inferior a 0.6 no ocurre proliferación microbiana, por lo que estos productos pueden ser considerados muy estables en este sentido.

En la Fig. 4.2 se muestra la distribución de zinc y azufre sobre la superficie de los polvos con zinc y extracto de yerba mate.

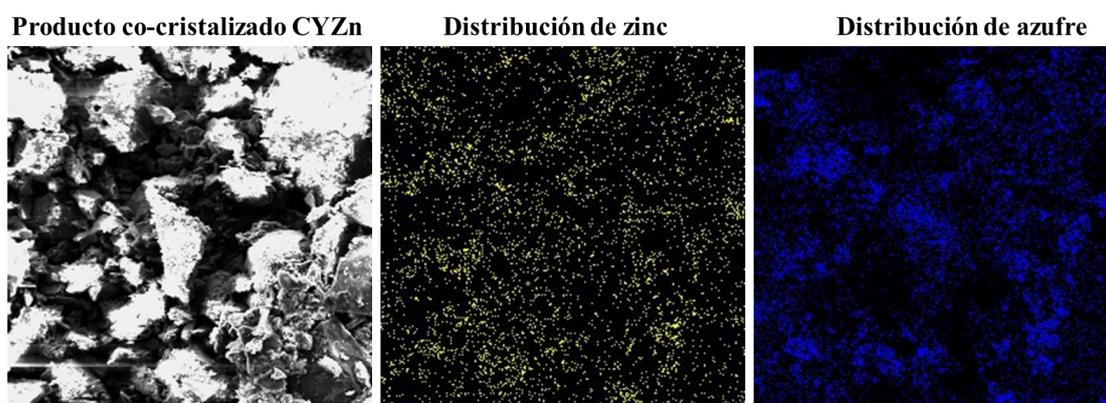


Figura 4.2. Distribución de zinc y azufre sobre la superficie de los polvos con zinc y extracto de yerba mate determinada mediante SEM y microanálisis de EDX.

Similar a lo observado para los polvos con zinc sin extracto de yerba mate (Capítulo 3), los productos mostraron una distribución homogénea de zinc sobre la superficie. Sin embargo, en algunas regiones la distribución de azufre no fue uniforme.

### 3. Estabilidad térmica y patrones de difracción de rayos X

En la Fig. 4.3 se muestran los termogramas DSC de los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn), obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.

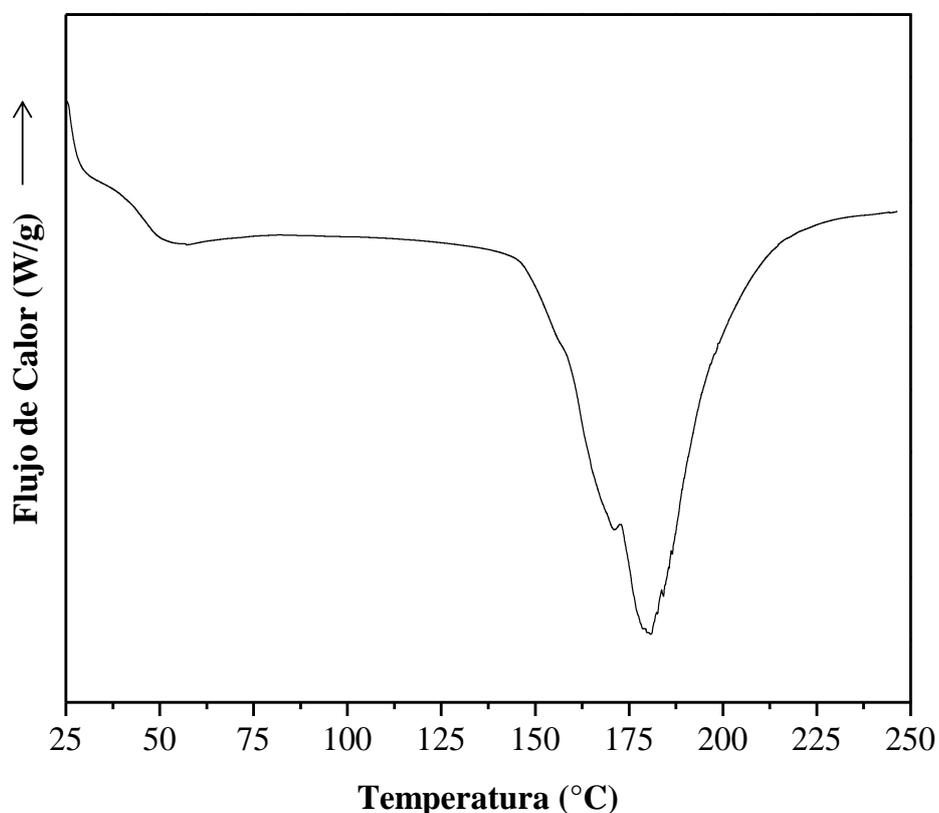


Figura 4.3. Termogramas DSC de los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn) obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.

Se observó una endoterma alrededor de 49°C ( $\Delta H=7.6$  J/g), también detectada en el termograma del sulfato de zinc (Fig.3.6). Además se encontró una banda ancha alrededor de 178°C ( $\Delta H=253$  J/g), atribuida a la fusión simultánea de los compuestos activos y la matriz encapsulante. Para los polvos CY10 y CZn, dicha endoterma fue detectada a 187 ( $\Delta H=86.4$  J/g) y 201°C ( $\Delta H=165$  J/g), respectivamente. El corrimiento de esta transición térmica hacia valores menores de temperatura puede ser atribuido a la degradación de los compuestos activos durante el proceso de co-cristalización.

Con respecto a los patrones de difracción de rayos X, las muestras CYZn mostraron picos agudos bien definidos, indicando que la matriz se mantiene en estado cristalino luego del proceso de co-cristalización. La mayoría de las señales de los polvos CYZn, excepto el pico a  $2\theta=11.7^\circ$ , mostraron más baja intensidad en comparación con los aglomerados control, atribuida a una disminución en el grado de cristalinidad de la muestra.

#### 4. Análisis de interacciones mediante FT-IR

El espectro de IR obtenido para los polvos con zinc y extracto de yerba mate se muestra en la Fig. 4.4.

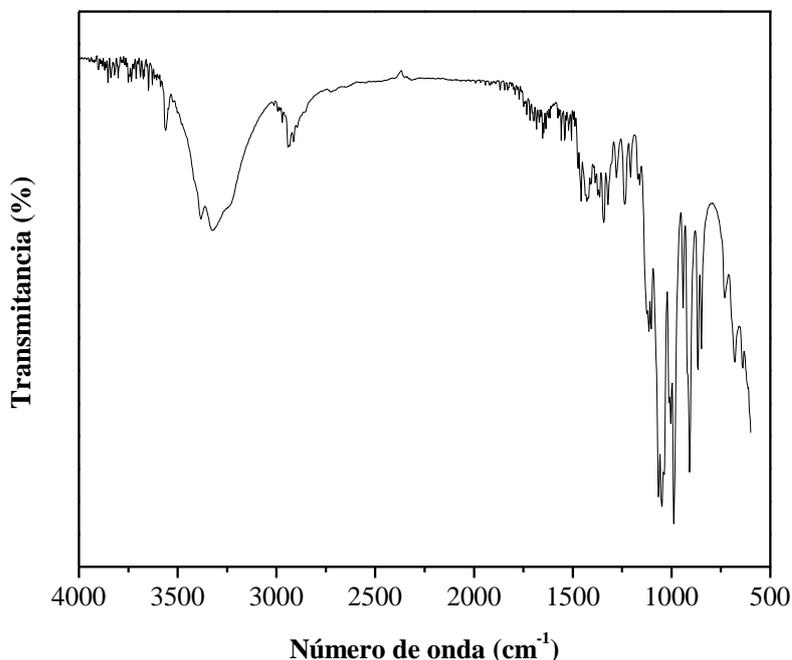


Figura 4.4. Espectro de infrarrojo de los productos con zinc y extracto yerba mate obtenidos mediante co-cristalización en matrices de sacarosa.

Los productos mostraron un espectro similar al de la sacarosa detectando las principales señales a 3319, 2941, 2983, 1122, 1069, 1061, 1059, 1011, 995 y 941  $\text{cm}^{-1}$  (Brizuela y col., 2012; Gopi y col., 2013). No se observaron bandas atribuibles a interacciones entre los compuestos activos, probablemente debido a la baja concentración de éstos en relación a la sacarosa.

De Souza y De Giovanni (2005) estudiando interacciones entre flavonoides y metales ( $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Al}^{+3}$ ) mediante espectroscopia de IR, observaron cambios en la ubicación de las bandas correspondientes a los grupos carbonilos ( $\text{C}=\text{O}$ ) y éstos fueron atribuidos a la formación de interacciones entre ellos. Además observaron una mayor actividad antioxidante para los complejos, con respecto a los flavonoides libres, debida a una disminución en sus potenciales de oxidación.

## 5. Propiedades de flujo de los polvos con zinc y extracto de yerba mate

Los polvos con zinc y extracto de yerba mate (CYZn) mostraron valores de ángulos de reposo de  $39.9^\circ$  e índices de Hausner de 1.1. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para los aglomerados control y los polvos con extracto de yerba mate (CY10). En cambio, los productos con ambos compuestos activos CYZn mostraron mejores propiedades de fluidez con respecto a los polvos con zinc (ángulo de reposo= $47^\circ$  e IH=1.2).

Por otro lado, las muestras CYZn presentaron valores de índices de Carr de alrededor del 13%, característicos de materiales con buena fluidez y compresibilidad (USP 30-NF 25, 2007). Valores similares fueron obtenidos para los polvos con zinc (IC=12%), mientras que los productos con extracto de yerba mate (CY10) mostraron valores menores de IC (4%) correspondientes a mejores propiedades de compresibilidad. Como se mencionó en el Capítulo 2, es posible que este extracto actúe como ligante favoreciendo la formación de uniones entre partículas, bajo presión (Nyström y col., 1993; Raymond y col., 2006).

## 6. Estabilidad fisicoquímica de los polvos con zinc y extracto de yerba mate

Respecto a la estabilidad de los polvos durante el tiempo de almacenamiento, la Fig. 4.5 muestra el contenido de humedad de los aglomerados control y los productos con zinc y extracto de yerba mate.

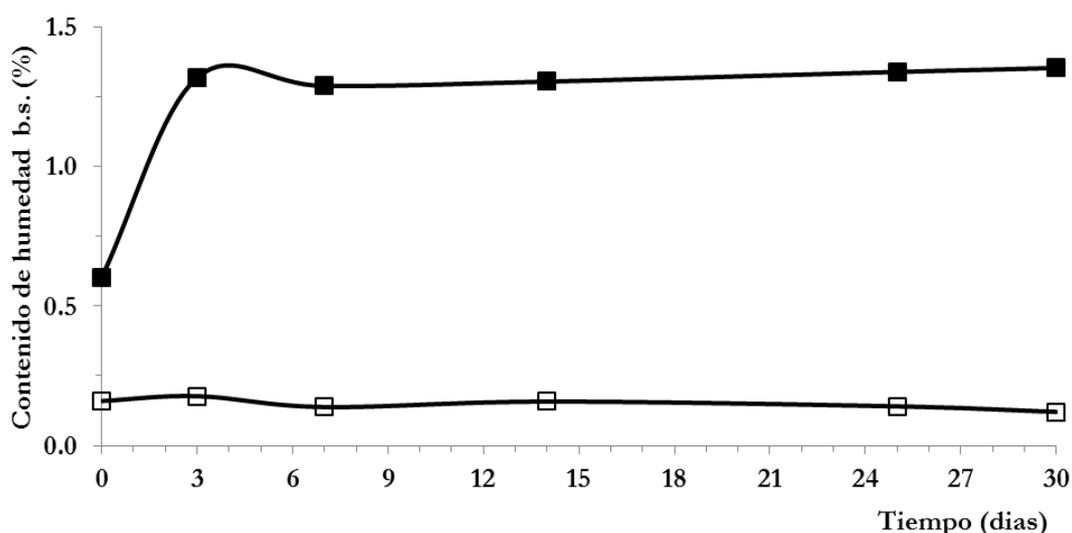


Figura 4.5. Contenido de humedad en función del tiempo de la muestra control (□) y los productos con zinc y extracto de yerba mate (■) bajo condiciones de 75% HR y  $20^\circ\text{C}$ .

Los polvos con zinc y extracto de yerba mate presentaron un incremento en su contenido de humedad desde 0.6 a 1.3% luego de 30 días, mientras que el contenido de humedad de la muestra control se mantuvo constante a lo largo del ensayo. La ganancia de agua de estos productos fue atribuida al aumento de su tendencia a adsorber vapor de agua del ambiente, debido a la deshidratación sufrida por la sal durante el proceso de co-cristalización.

Con respecto a la higroscopicidad, se obtuvieron valores de alrededor de 0.74%, característicos de productos poco higroscópicos. Por otro lado, la higroscopicidad de los productos con extracto de yerba mate y zinc fue mayor que las de las muestras control (0.014%), pero menor que la de los polvos conteniendo solo zinc (2%). Como ya se mencionó, los bajos valores de higroscopicidad de los polvos constituyen una ventaja importante para estos productos debido a que pueden conservarse en empaques de menor costo.

En la Fig. 4.6 se muestran micrografías SEM de los polvos con zinc y extracto de yerba mate antes y después de almacenados 30 días a 75% HR y 20°C. Los polvos no mostraron apelmazamiento ni cambios importantes en su morfología.

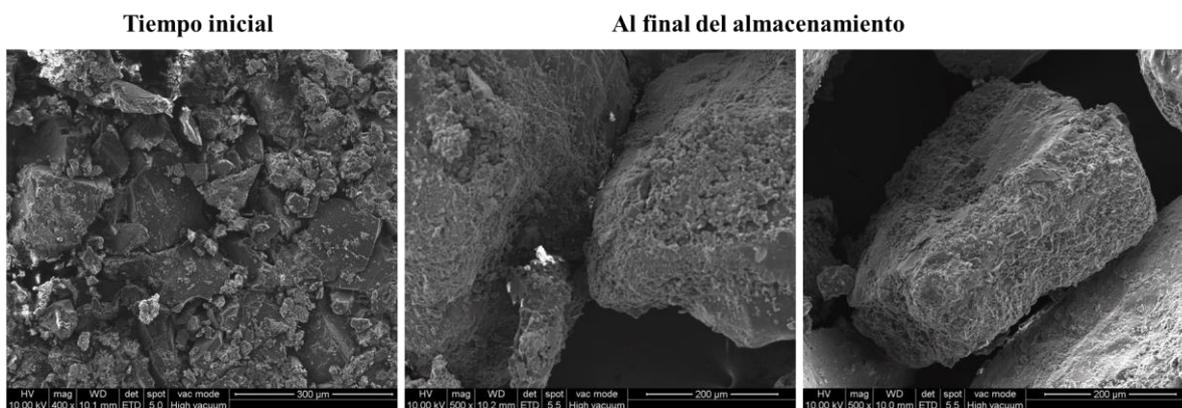


Figura 4.6. Micrografías SEM de los polvos con zinc y extracto de yerba mate antes y después de almacenados 30 días a 75% HR y 20°C.

Con respecto al contenido de compuestos activos, no se encontraron cambios significativos en el contenido de polifenoles totales durante el almacenamiento ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observó un aumento en la actividad antioxidante de los productos (Fig. 4.7).

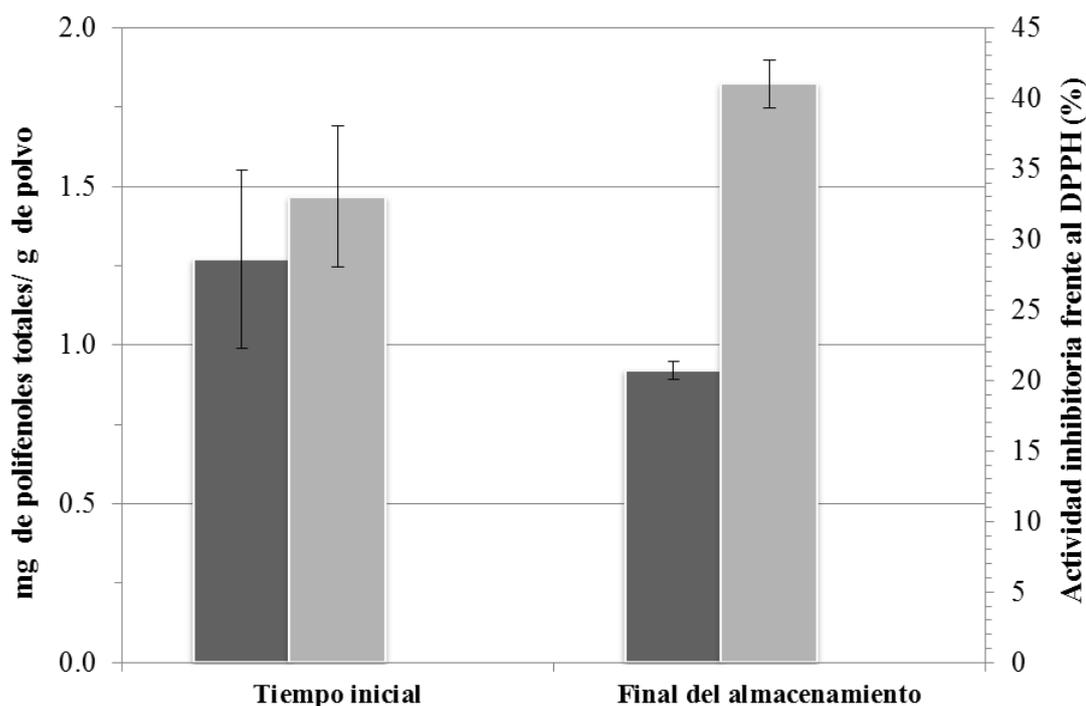


Figura 4.7. Contenido de polifenoles totales (barras negras) y actividad antioxidante (barras grises) de los polvos con zinc y extracto de yerba mate antes y después de almacenados 30 días a 75% HR y 20°C.

El contenido de zinc ( $10.2 \pm 1.4$  mg Zn/ g polvo) se mantuvo constante hasta el final del almacenamiento. Los valores bajos de contenido de humedad, actividad acuosa e higroscopicidad de estos polvos constituyen una ventaja importante para su estabilidad previniendo posibles interacciones entre los compuestos activos y manteniendo sus propiedades fisicoquímicas.

## 7. Tabletas comprimidas con zinc y extracto de yerba mate

### 7.1. Propiedades de las formulaciones de los comprimidos

Las formulaciones de los comprimidos conteniendo polvos con zinc y extracto de yerba mate y almidón de maíz (diluyente) mostraron contenidos de humedad de alrededor de 1.6%. Con respecto a la fluidez, se obtuvieron ángulos de reposo mayores de 50°. Sin embargo, los índices de Hausner y Carr fueron de 1.2 y 19.2%, respectivamente; característicos de materiales con fluidez aceptable (USP 30-NF 25, 2007).

## 7.2. Propiedades físicas de los comprimidos

Las propiedades físicas de los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate se muestran en la Tabla 4.2. Como en el caso de las tabletas con solo zinc, los comprimidos con ambos compuestos activos mostraron buena uniformidad en peso, lo cual es favorable desde el punto de vista de la dosificación.

Tabla 4.2. Propiedades fisicoquímicas de los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate.

Parámetro	
Peso promedio (mg)	$437 \pm 25$
Espesor (mm)	$5.0 \pm 0.2$
Densidad ( g cm <sup>-3</sup> )	$1.4 \pm 0.3$
Dureza (kg-f)	$7.7 \pm 2.0$
Tiempo de desintegración <i>in vitro</i> (min)	$5.8 \pm 0.6$

Se obtuvieron valores de dureza de alrededor de 7 kg-f, los cuales son considerados adecuados para el manipuleo de las tabletas (Lee, 2007). Estos fueron menores a los observados para los comprimidos obtenidos a partir de los polvos con solo zinc (4.8 kg-f). El incremento en la dureza fue atribuido al efecto sinérgico del extracto de yerba mate como ligante y las buenas propiedades de compactibilidad del sulfato de zinc.

Con respecto a los tiempos de desintegración, se obtuvieron valores menores de 10 min que son considerados óptimos para formas de dosificación solidas administradas por vía oral (Tabla 4.2).

Por otro lado, se observó una distribución homogénea de zinc y azufre en la superficie y en interior de las tabletas con zinc y extracto de yerba mate (Fig. 4.8). Además, se encontraron zonas con gránulos de almidón, éstos no se encontraron homogéneamente distribuidos en la matriz probablemente debido a efectos de segregación de las formulaciones y al mezclado manual.

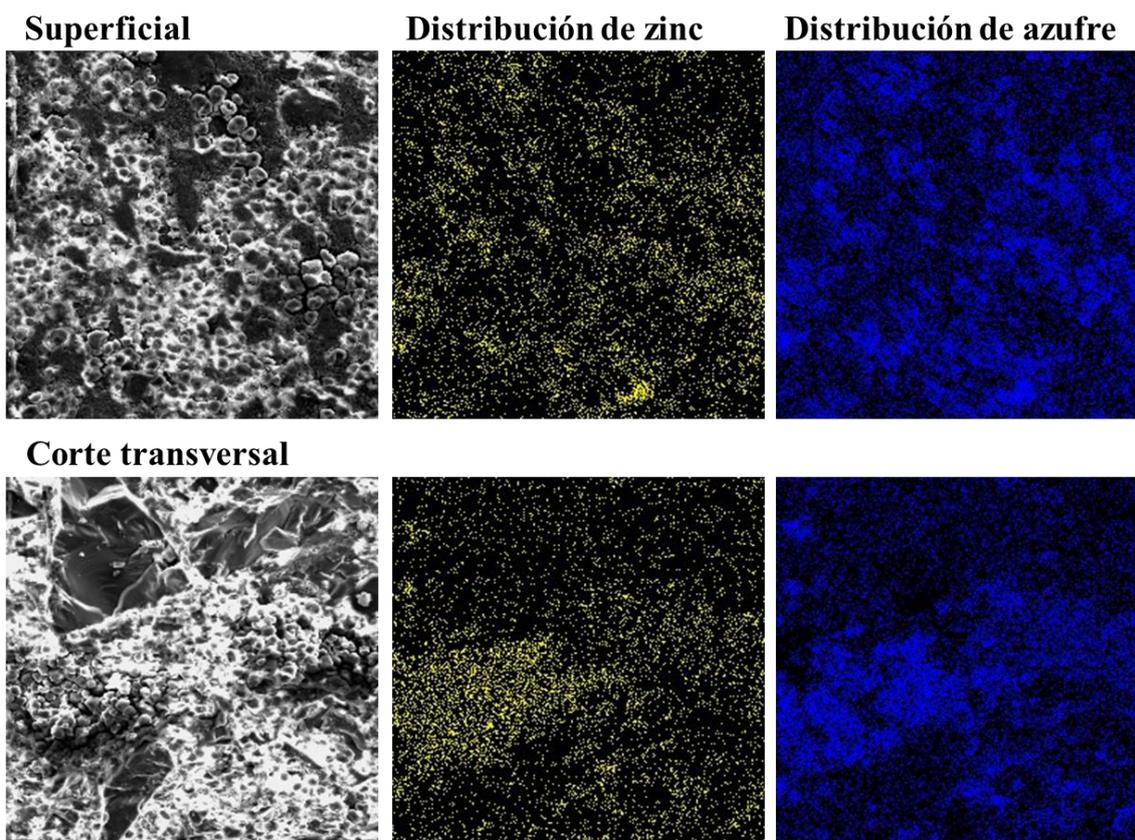


Figura 4.8. Distribución de zinc y azufre en los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate determinada mediante SEM y microanálisis de EDX.

### 7.3. Contenido de compuestos activos de las tabletas

Con respecto al mineral, se determinó una concentración de  $4.14 \pm 0.68$  mg Zn por tableta. Dicha concentración es similar a la de los comprimidos con solo zinc en su composición, debido a que en el proceso de preparación se ajustó el peso de las tabletas para mantener la misma dosis (40% de la IDR para adultos) (WHO y FAO, 2004).

En el caso de los polifenoles se halló una concentración de  $0.53 \pm 0.07$  mg por tableta. Además, estos comprimidos mostraron una buena contribución de polifenoles totales (1.2 mg de polifenoles/ g tabletas) en relación a la ingesta diaria de estos compuestos desde el consumo de frutas y verduras (alrededor de 5 mg/g solido seco) (Saura-Calixto y Goñi, 2006). En la Tabla 4.3 se muestran las concentraciones de ácido clorogénico, rutina y cafeína presente en los comprimidos, determinadas por HPLC.

Tabla 4.3. Concentraciones de compuestos fenólicos y cafeína de los comprimidos con extracto de yerba mate y zinc.

Compuesto activo	mg/ g comprimido
Ácido clorogénico	$0.24 \pm 0.03$
Ácido cafeico	nd
Rutina	$0.08 \pm 0.002$
Cafeína	$0.20 \pm 0.02$

nd: no detectado.

Actualmente, no se ha establecido una ingesta diaria recomendada para compuestos fenólicos. Sin embargo, el consumo de estas tabletas se encuentra limitado a un máximo de 3 tabletas por día, considerando la IDR de zinc (WHO y FAO, 2004).

## **Conclusiones parciales**

1. La co-cristalización simultánea de zinc y extracto de yerba mate en matrices de sacarosa provocó una fuerte disminución en el contenido de estos compuestos y un descenso significativo en la actividad anti-radical del extracto.
2. Los polvos con zinc y extracto de yerba mate obtenidos mediante co-cristalización mostraron buenas características de compresibilidad y fluidez.
3. Los compuestos activos co-cristalizados en matrices de sacarosa mostraron una buena estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento.
4. Se observó una distribución homogénea de zinc en el exterior y el interior de las tabletas.
5. Los comprimidos con zinc y extracto de yerba mate mostraron valores óptimos de dureza y de tiempo de desintegración *in vitro* para su dosificación por vía oral.

## **Capítulo 5. SISTEMAS COMPARTIMENTALIZADOS PARA CO-VEHICULIZACIÓN DE ZINC Y ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE**

### **Introducción**

Los desafíos actuales en la industria de alimentos han generado la necesidad de obtención de productos funcionales con varios principios activos, que sean de fácil manipuleo, estables, versátiles y de bajo costo. Sin embargo, durante las operaciones de producción y almacenamiento algunos compuestos pueden interaccionar con la matriz u otros componentes del sistema generándose una pérdida de actividad (Papadopoulou y Frazier, 2004; Parada y Aguilera, 2007).

La compartimentalización constituye una estrategia actual para la vehiculización de varios compuestos activos, con diferente actividad biológica o química, sin que se afecten sus propiedades funcionales. Esta metodología permite el aislamiento y la protección de cada compuesto evitando las interacciones y el deterioro entre ellos. En los sistemas compartimentalizados, los compuestos activos son atrapados previamente en distintos encapsulantes y luego éstos se combinan para formar una sola matriz (Hosseini y col., 2013; Rømer Rassing, 1994). Otra estrategia empleada es la aplicación de un recubrimiento (“coating”, en inglés) a cada ingrediente previo a la mezcla (Cho y Park, 2002; Ivanova y col., 2005).

El almidón es utilizado ampliamente en las industrias de alimentos y farmacéuticas debido a que es de fácil disponibilidad, no tóxico, biodegradable y de bajo costo (Smigielska y col., 2005; Vilivalam y col., 2000). A diferencia de otros polímeros, el almidón se encuentra en la naturaleza como complejas partículas discretas con ordenamiento radial denominadas gránulos. Éstos están constituidos mayormente por una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina (Fennema y Tannenbaum, 1996). En la fabricación de formas de dosificación, el almidón es empleado comúnmente como diluyente, disgregante, ligante y espesante (Jivraj y col., 2000). Otra aplicación importante para este polímero es su uso como material inerte de relleno de cápsulas. Con el agregado de almidón se ha observado un aumento de la resistencia mecánica, la conservación de la forma y del tamaño de las cápsulas, mayor estabilidad del material encapsulado durante el

almacenamiento y un efecto modulador de la velocidad de liberación de compuestos hidrofílicos (Chan y col., 2011; López-Córdoba y col., 2013, 2014c; Rassis y col., 2002).

La funcionalización de almidón con compuestos bioactivos constituye una nueva estrategia para formulación de productos de interés para la salud. Varios autores han investigado la capacidad del almidón de formar complejos con metales de transición y de atrapar compuestos tales como: drogas, aromatizantes, vitaminas, entre otros. En la Tabla 5.1 se muestran algunos de los estudios reportados en literatura referentes a almidones funcionalizados con compuestos activos.

Tabla 5.1. Estudios reportados en literatura referentes a almidones funcionalizados con compuestos activos.

<b>Material encapsulante</b>	<b>Compuestos activos</b>	<b>Referencia</b>
Amilosa, almidón de maíz común, ceroso (“waxy”) y alta amilosa	Mentol, mentona y limoneno	Ades H. (2012)
Almidón de papa y almidón de maíz ceroso	Curcumina, timol, ácido ascórbico, ibuprofeno, benzocaína y sulfapiridina.	Janaswamy (2014)
Almidón de maíz tratado con alta presión	Extracto de yerba mate	Deladino y col. (2014)
Almidón de mandioca nativo y modificado	$\beta$ -caroteno	Loksuwan (2007)
Almidón de maíz ceroso acetilado y fosforilado	Aceite esencial de naranja	Murúa-Pagola y col. (2009)
Almidón de papa nativo y acetilado	Ácido gálico	Robert y col. (2012)
Almidón de maíz nativo y modificado enzimáticamente	Aceite de menta	Zhao y col. (1996)
Amilopectina, almidón de papa, almidón de maíz común y ceroso	Metales de transición ( $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cr}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ y $\text{Zn}^{2+}$ )	Ciesielski y col. (2003), Ciesielski y Tomasik (2003), Lii y col. (2002), Staroszczyk y Janas (2010), Fernández y col. (2008), (Smigielska y col., 2005) y Luo y col. (2013a)

El objetivo de este capítulo fue desarrollar sistemas compartimentalizados para la vehiculización simultánea de zinc y extracto de yerba mate. Se analizó la capacidad del almidón de maíz nativo de transportar zinc y se caracterizaron los sistemas obtenidos.

## Materiales y métodos

### 1. Preparación de los sistemas compartimentalizados

En la Fig. 5.1 se muestra una representación esquemática del proceso de producción de comprimidos compartimentalizados con extracto de yerba mate y zinc.

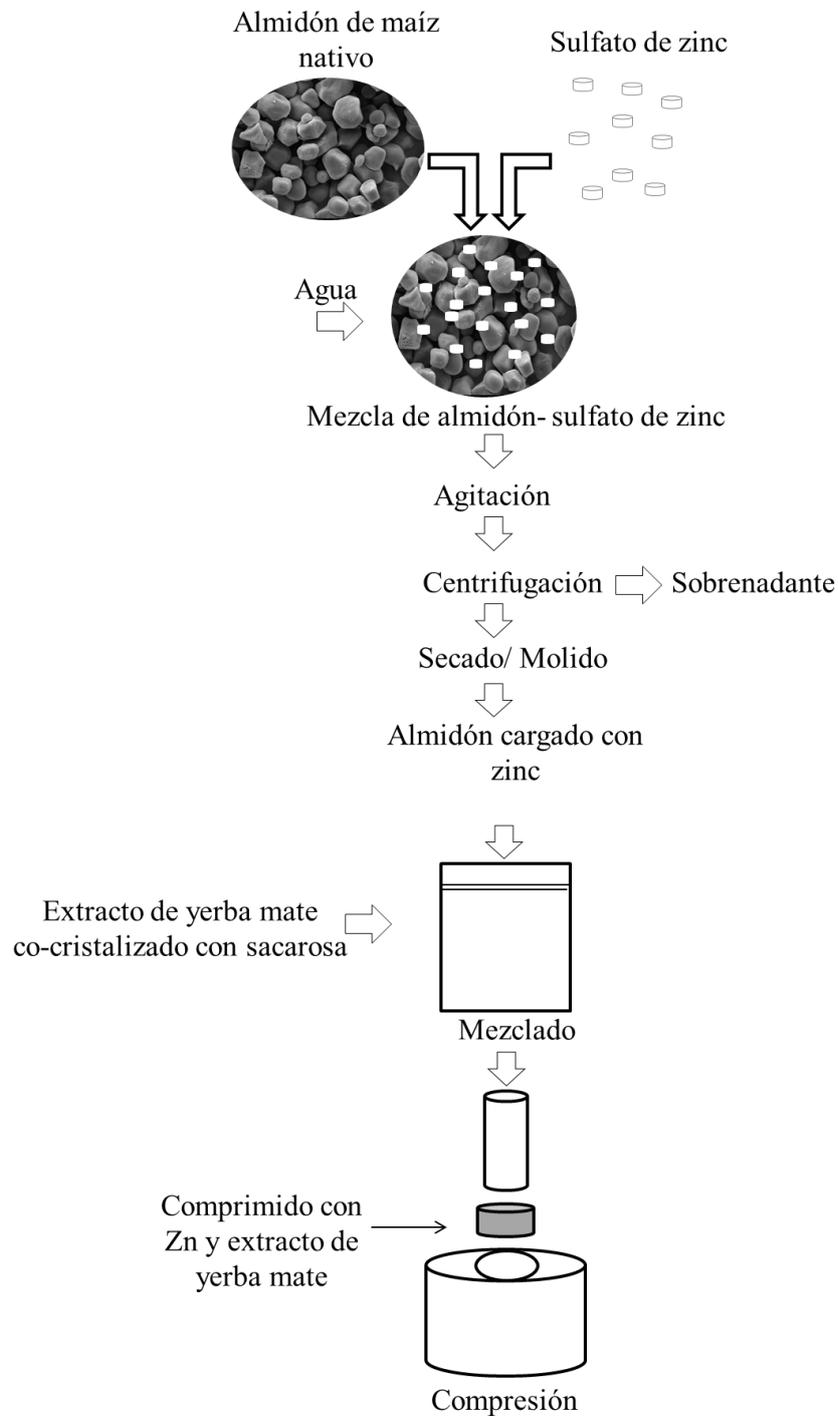


Figura 5.1. Representación esquemática del proceso de producción de tabletas compartimentalizadas con extracto de yerba mate y zinc.

A continuación se detallan cada una de las etapas del proceso:

### *1.1. Preparación y caracterización de los almidones cargados con zinc*

Los almidones cargados con zinc fueron obtenidos usando la metodología descrita en trabajos anteriores (López-Córdoba, 2012; López-Córdoba y col., 2014b). Se preparó una suspensión (10 g/100 mL) de almidón de maíz (Molinos Río de La Plata, Argentina) en agua Milli-Q. A esta suspensión se le adicionó 1.32 g de sulfato de zinc heptahidratado/g almidón. La mezcla se colocó en tubos herméticos y se llevaron a un agitador orbital por 15 h a 25°C y 180 rpm. Luego los tubos se centrifugaron (20 min a 300g) y se descartó el líquido sobrenadante. Los productos obtenidos se secaron a 30°C durante 48 h, luego fueron molidos y se almacenaron en recipientes herméticos hasta su análisis. El porcentaje de adsorción de zinc sobre los gránulos se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de adsorción de Zn} = \left( \frac{m_{St}}{m_{Sol}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

donde  $m_{St}$  es la masa de zinc por gramo de almidón cargado con zinc y  $m_{Sol}$  es la masa de zinc por gramo de almidón nativo, empleada en la formulación.

La morfología de los almidones cargados con zinc y de los gránulos de almidón nativo fue analizada mediante microscopía de barrido confocal. Se realizó la observación de gránulos intactos y de secciones transversales obtenidas por crio-fractura. Previo al análisis, se prepararon suspensiones de las muestras (5 mg/mL) y a éstas se les adicionó isotiocianato de fluoresceína (0.3 mg/mL) como marcador. Se empleó un equipo LEICA TCS SP5 (Mannheim, Alemania) equipado con láser de Ar y HeNe. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 488 y 518 nm, respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas usando el objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO CS 63.0x1.40 y con una resolución de 1024 x 1024 píxeles. El análisis de imágenes se realizó empleando el programa LAS AF versión 2.2.1. build 4842.

Se realizó un mapeo de zinc y azufre sobre la superficie de los gránulos mediante SEM-EDX. Se empleó un equipo ZEISS DSM-969 equipado con unidad EDX (ISIS-LINK, Oxford Inst., Alemania). Las muestras se adhirieron con una cinta de doble faz sobre los porta-muestras cilíndricos y se recubrieron con carbón conductor.

Los almidones también fueron analizados mediante difracción de rayos X. El grado de cristalinidad (GC) se calculó como el cociente entre el área de absorción atribuida a la región cristalina y el área total del difractograma de la muestra (Mali y col., 2002).

La integración de las áreas fue llevada a cabo usando el programa OriginPro 8. La identificación de los principales grupos funcionales presentes en las muestras se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), como fue descrito en el Capítulo 2.

La conductividad es una medida utilizada comúnmente para evaluar la formación de complejos de almidón y metales de transición (Luo y col., 2013b). Se prepararon soluciones acuosas (0.5 mol/L) de sulfato de zinc y suspensiones (5 g/100 mL de agua Milli-Q) de almidón de maíz nativo y de los vehículos almidón-zinc. Se midió la conductividad de estas muestras utilizando un conductímetro (Mettler Toledo, EE.UU.) a 20°C.

### *1.2. Preparación de los comprimidos compartimentalizados*

Se emplearon los polvos con extracto de yerba mate CY10 (1.8 mg/g producto). El protocolo de preparación y las características fisicoquímicas de estos materiales se describieron en el Capítulo 2. Las curvas de compactibilidad de los polvos CY10 (fuerza de compresión vs. dureza del comprimido) se obtuvieron en forma similar a lo descrito para los polvos de zinc en el Capítulo 3.

Se evaluaron distintas concentraciones de almidón para encontrar la dosis de este material que permitiera la mayor incorporación de zinc al sistema y obtener tabletas con características óptimas. Se prepararon formulaciones conteniendo polvos CY10 o sus mezclas con almidón de maíz nativo (Unilever, España) en distintas proporciones (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Formulaciones de los comprimidos obtenidos a partir de polvos con extracto de yerba mate y sus mezclas con almidón de maíz. Peso de un comprimido= 450 mg.

Ingrediente	TY1	TY2	TY3	TY4
Polvo con extracto de yerba mate (mg)	445.5	378.7	356.4	311.8
Almidón de maíz nativo (mg)	-	66.8	89.1	133.7
Estearato de magnesio (mg)	4.5	4.5	4.5	4.5

Adicionalmente, se prepararon formulaciones mezclando sacarosa comercial y almidón de maíz, para comparación. En todos los casos las mezclas fueron adicionadas de estearato de magnesio (Bagó, Argentina) y los ingredientes fueron pasados a través de una malla de 500  $\mu\text{m}$  antes de su uso.

Previo a la compresión, se determinó el contenido de humedad, el ángulo de reposo, el índice de Hausner (IH) y el índice de compresibilidad de Carr (IC) de las mezclas.

Las formulaciones en polvo fueron comprimidas según lo descrito en el Capítulo 3, ajustando la compresora mono-punzón para obtener tabletas con pesos entre 400-450 mg y diámetro constante de 9 mm.

## **2. Caracterización de los comprimidos compartimentalizados**

Las tabletas obtenidas a partir de las formulaciones seleccionadas fueron caracterizadas siguiendo los métodos recomendados por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007). Se realizaron ensayos de uniformidad en peso, diámetro, espesor, densidad, dureza y tiempo de desintegración *in vitro*. Estos protocolos fueron descritos en el Capítulo 3.

El contenido de compuestos fenólicos se determinó mediante los métodos de Folin-Ciocalteu y HPLC. La concentración de zinc fue determinada mediante espectroscopía de absorción atómica. El análisis morfológico de la superficie exterior e interior de los comprimidos se realizó mediante microscopía SEM. Los atributos sensoriales de las tabletas fueron evaluados por un panel conformado por 10 jueces no entrenados, usando una escala hedónica de 9 puntos (1 = “me disgusta mucho”; 5= ni me gusta, ni me disgusta; 9 =“me gusta mucho”).

## **3. Ensayos de liberación *in vitro***

El ensayo de liberación se realizó empleando un método adaptado de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30-NF 25, 2007). Se introdujo una cantidad conocida de muestra en un Erlenmeyer conteniendo 20 mL de agua Milli-Q y se llevó a un agitador orbital (Lab-Line Instruments, EE.UU.) a 37°C y 120 rpm.

Se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de cada compuesto activo liberada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Liberación} = \left( \frac{m_t}{m_\infty} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 5.2}$$

donde  $m_t$ , corresponde a la masa de compuesto activo liberada a tiempo  $t$  y  $m_\infty$  es la masa de compuesto activo cargada inicialmente en las muestras. La masa de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu y la cantidad de zinc mediante espectroscopía de absorción atómica.

La comparación entre los perfiles de liberación de los compuestos activos desde los diferentes sistemas se realizó calculando el factor de similitud ( $f_2$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 - \left( \frac{1}{q} \right) \sum_{t=1}^q (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde  $q$  es el número de tiempos de disolución ensayados,  $R_t$  y  $T_t$  son los porcentajes de compuesto activo liberados a cada tiempo de las dos muestras comparadas. Valores de  $f_2$  entre 50 y 100 son característicos de perfiles de liberación similares (Costa y Sousa Lobo, 2001).

Los perfiles de liberación de los compuestos activos se analizaron mediante diferentes modelos matemáticos semi-empíricos. Los parámetros de cada ecuación fueron calculados mediante el software DDSolver (Zhang y col., 2010).

- Modelo de la ley de la potencia (Korsmeyer y Peppas, 1986):

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k \cdot t^n \quad \text{Ec. 5.4}$$

donde  $m_t/m_\infty$ , representa la fracción de compuesto activo liberada a tiempo  $t$ ,  $k$  es una constante relacionada con características estructurales y geométricas del sistema y  $n$  es el exponente que indica el tipo de mecanismo de liberación involucrado. Este modelo es válido para fracciones  $m_t/m_\infty < 0.6$  (Korsmeyer y col., 1986; Ritger y Peppas, 1987).

- Modelo de difusión-relajación (Peppas y Sahlin, 1989):

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k_d \cdot t^m + k_r \cdot t^{2m} \quad \text{Ec 5.5}$$

donde  $k_d$  y  $k_r$  representan las constantes de los mecanismos de difusión y relajación, respectivamente; y  $m$  es el exponente difusional. En la Ec. 5.5 el primer término corresponde a la contribución difusional, mientras que el segundo término representa la contribución de la relajación del caso II, del modelo de Korsmeyer y Peppas (Korsmeyer y col., 1986; Peppas y Sahlin, 1989).

- Modelo cinético de primer orden:

$$\frac{m_t}{m_\infty} = e^{-k_1 t} \quad \text{Ec. 5.6}$$

donde  $k_1$  es la constante cinética.

## Resultados y discusión

### 1. Almidones cargados con zinc

El contenido total de zinc cargado en el almidón fue de 38 mg/g. Esta concentración corresponde al 12 % de la cantidad inicial de mineral utilizada en la formulación. El bajo rendimiento de adsorción de mineral pudo ser debido a que las concentraciones de  $\text{Zn}^{+2}$  empleadas para la formulación de los vehículos superaban inicialmente los sitios de unión de mineral y el área de adsorción disponible del almidón nativo. Luo y col. (2013a) informaron rendimientos mayores en la formación de complejos de zinc con almidón de mandioca modificado enzimáticamente, empleando concentraciones de acetato de zinc entre 0.05-2 mol/L en la solución precursora.

En la Fig. 5.2 se muestran las micrografías obtenidas por microscopía confocal de los almidones nativos y los cargados con zinc.

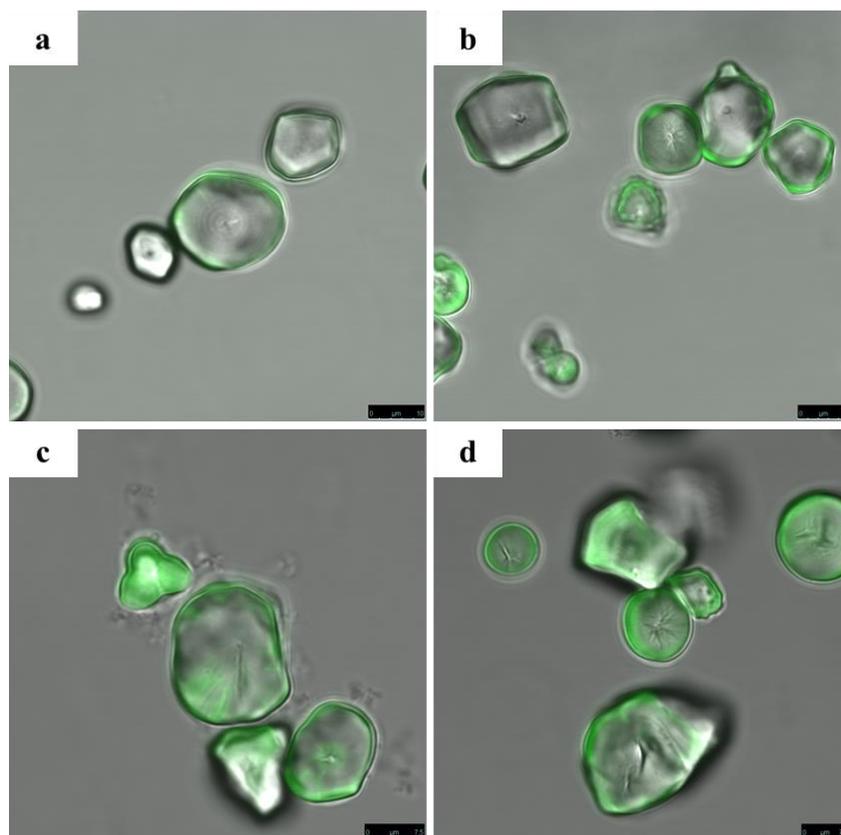


Figura 5.2. Micrografías de gránulos intactos de almidón de maíz nativo y cargado con zinc (a y c) y de secciones transversales (b y d), respectivamente. Barra de escala=7μm.

Los almidones cargados con zinc mostraron gránulos bien conservados, similares a los del almidón nativo, indicando que el proceso de preparación no tuvo ningún efecto sobre la morfología de los gránulos. Además, en las dos muestras se observó la presencia de canales internos. Chen y col. (2011) y Huber y BeMiller (2000) observaron resultados similares. Además, mediante SEM-EDX, se observó una distribución uniforme de zinc y de azufre sobre la superficie de los almidones vehículo (Fig. 5.3).

De acuerdo a Ciesielski y Tomasik (2003) y Tomasik y col. (2001) los complejos metal-almidón se forman cuando el anión penetra los gránulos, mientras que el catión es retenido mediante fuerzas electrostáticas sobre la superficie. En este sentido, la presencia de iones  $SO_4^{2-}$  en el exterior de los gránulos podría indicar que la sal empleada para la preparación del vehículo de almidón excedió la capacidad de los gránulos de embeber estos iones y retener zinc. Por lo que una fracción de zinc podría encontrarse unida por fuerzas electrostáticas y el exceso débilmente adsorbido sobre la superficie de los gránulos.

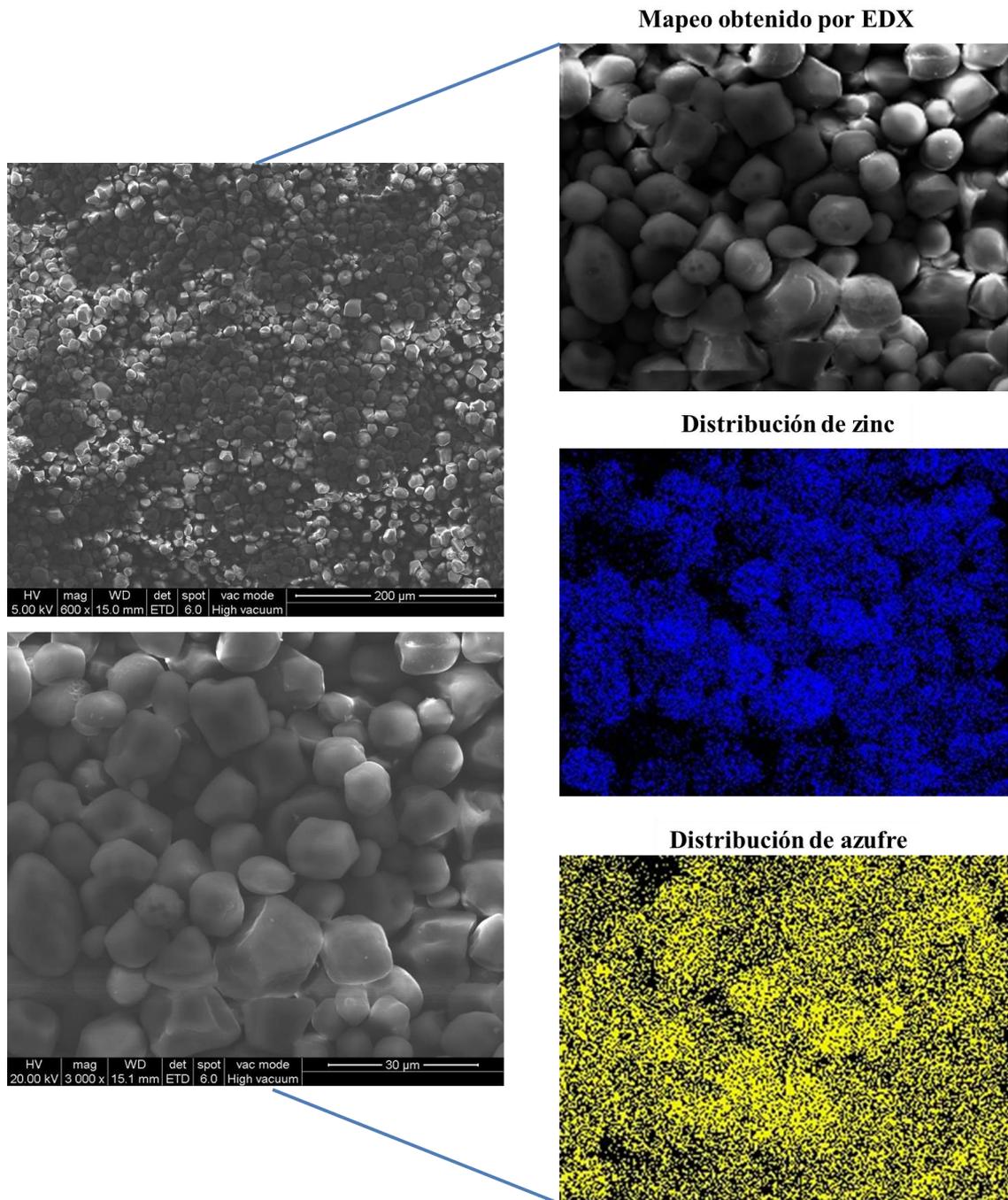


Figura 5.3. Distribución de zinc y azufre sobre los gránulos de los almidones vehículo.

Los patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y los cargados con zinc se muestran en la Fig. 5.4. Las dos muestras presentaron una estructura semi-cristalina con picos agudos a  $2\theta$  ( $^{\circ}$ )= 15.3, 17.5 y 23.1, característicos del patrón tipo A (Zobel, 1988). Los porcentajes de cristalinidad de los almidones nativos y los productos cargados con zinc fueron de alrededor de 20 y 27 %, respectivamente. El aumento de la cristalinidad en los vehículos fue atribuido a la presencia de la sal de zinc.

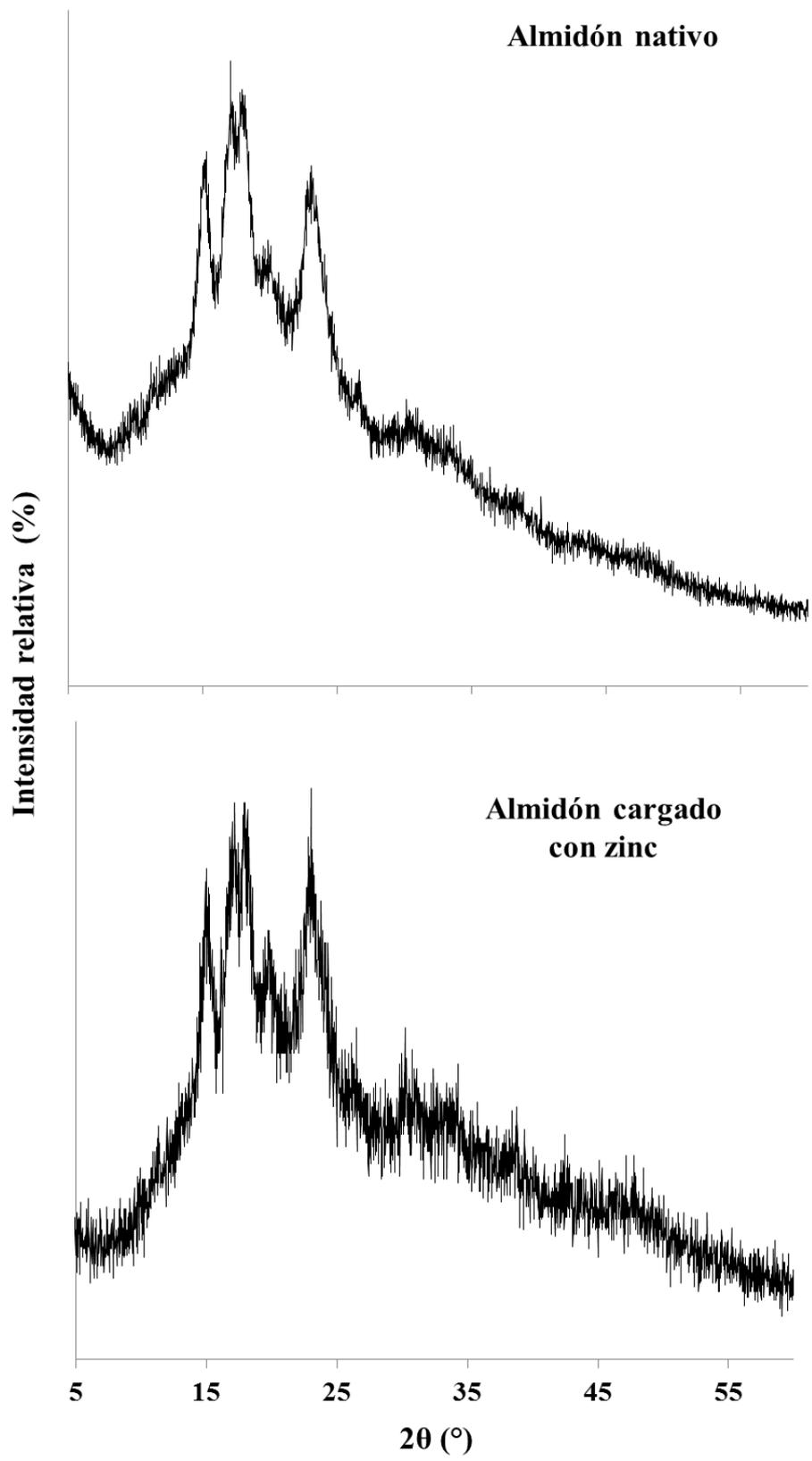


Figura 5.4. Patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y los vehículos cargados con zinc.

En la Fig. 5.5 se muestran los espectros IR obtenidos para el almidón nativo y los almidones cargados con zinc. Se detectaron señales similares en ambas muestras, por lo que la presencia de zinc no provocó cambios conformacionales significativos en el almidón (Tabla 5.3). Además, en el espectro de los almidones cargados con zinc se halló una señal a  $624\text{ cm}^{-1}$ , también observada en el espectro del sulfato de zinc, correspondiente a los modos de vibración de los grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  (Saha y Podder, 2011; Wang y col., 2004).

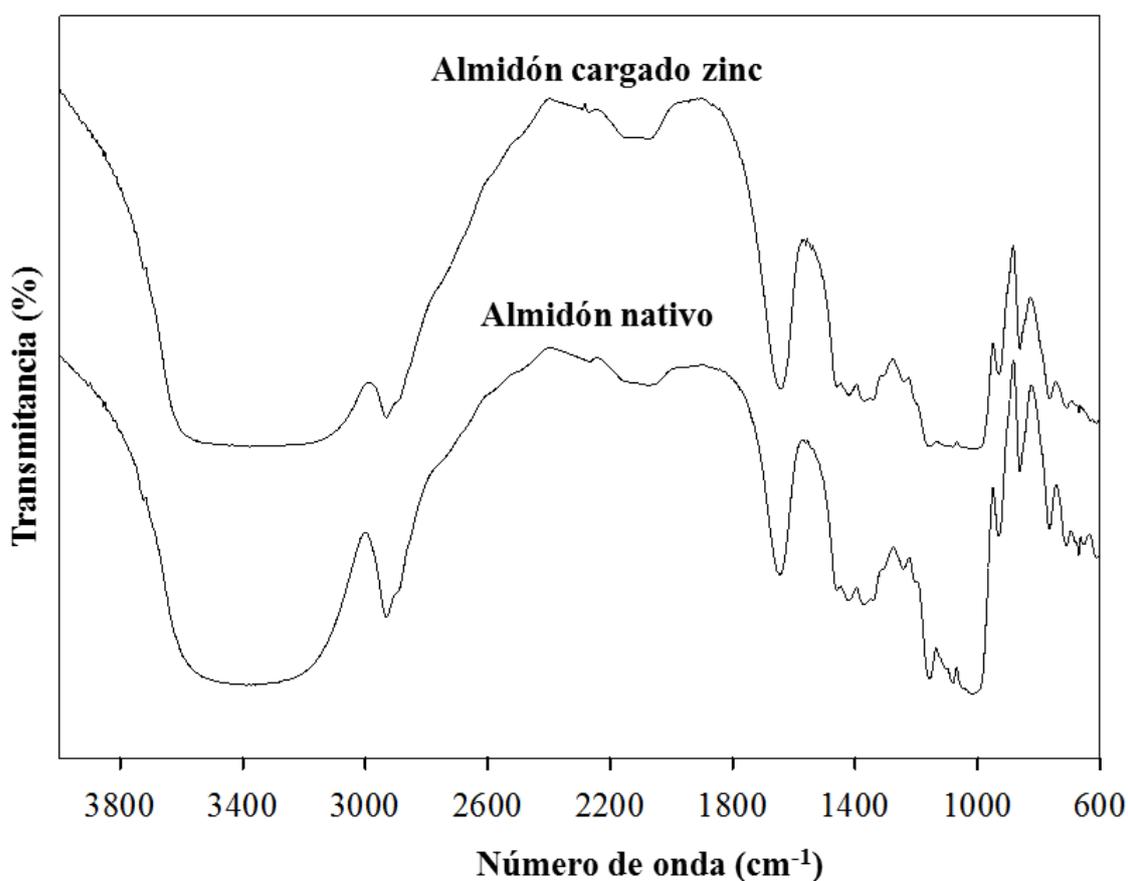


Figura 5.5. Espectros IR del almidón nativo y los almidones cargados con zinc.

La banda ancha, correspondiente al estiramiento de los grupos OH-, fue observada a  $3390\text{ cm}^{-1}$  para el almidón nativo. En las muestras con zinc esta banda se tornó más estrecha y se detectó alrededor de  $3350\text{ cm}^{-1}$ . De acuerdo a Luo y col. (2013a) y Staroszczyk y Janas (2010), estos cambios pueden ser atribuidos a la coordinación de iones de zinc a los átomos de oxígeno de las unidades de glucosa ( $6\text{-CH}_2\text{OH}$ ).

Tabla 5.3. Señales identificadas en los espectros de IR del almidón nativo y los almidones cargados con zinc.

Señales (cm <sup>-1</sup> )		
Almidón nativo	Almidón cargado con zinc	Grupo funcional
No detectada	633	iones SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> del ZnSO <sub>4</sub>
766	766	C-C
864	864	C-H, CH <sub>2</sub>
929	929	C-O-C
1018	1021	C-O
1080	1080	C-O-H
1104	1105	C-O
1155	1158	C-O, C-O-H
1204	1207	O-H
1243	1244	CH <sub>2</sub> OH
1305	1303	C-H
1335	1337	C-O-H, CH <sub>2</sub>
1370	1369	C-H
1420	1419	CH <sub>2</sub> , C-O-O
1458	1458	CH <sub>2</sub>
2934	2934	CH <sub>2</sub>
3390	3358	O-H

Según varios autores (Błaszczak y col., 2005; Ciesielski y Tomasik, 2004; Tomasik y col., 2001), los grupos hidroxilos de las cadenas de amilosa y amilopectina del almidón constituyen sitios potencialmente activos para la unión de metales. El zinc al ser un catión divalente puede atraer los átomos de oxígeno de las cadenas de los polímeros del almidón que tienen varios pares de electrones libres, formando enlaces intermoleculares. Ciesielski y col. (2003), mediante estudios de resonancia paramagnética electrónica evidenciaron la formación de complejos entre el almidón y sales de metales de transición, tales como: Co (II), Cr (III), Cu (II), Fe (III) y Mn (II).

Con respecto a la conductividad, se obtuvieron valores de 27.2 mS/cm para la solución de sulfato de zinc. En el caso de las suspensiones de almidón, se observó un descenso significativo en esta propiedad obteniéndose valores de 0.04 mS/cm para el almidón nativo y 2.6 mS/cm para el almidón cargado con zinc. Ciesielski y Tomasik (2003) y Luo y col. (2013a) obtuvieron resultados similares, siendo atribuido a la formación de complejos almidón-metal.

## 2. Tabletas compartimentalizadas con zinc y extracto de yerba mate

### 2.1. Compactibilidad de los polvos con extracto de yerba mate

En la Fig. 5.6 se muestra la curva de compactibilidad obtenida para los polvos CY10. Utilizando estos materiales fue posible obtener tabletas con valores óptimos de dureza a bajas fuerzas compresión (4.9 kN).

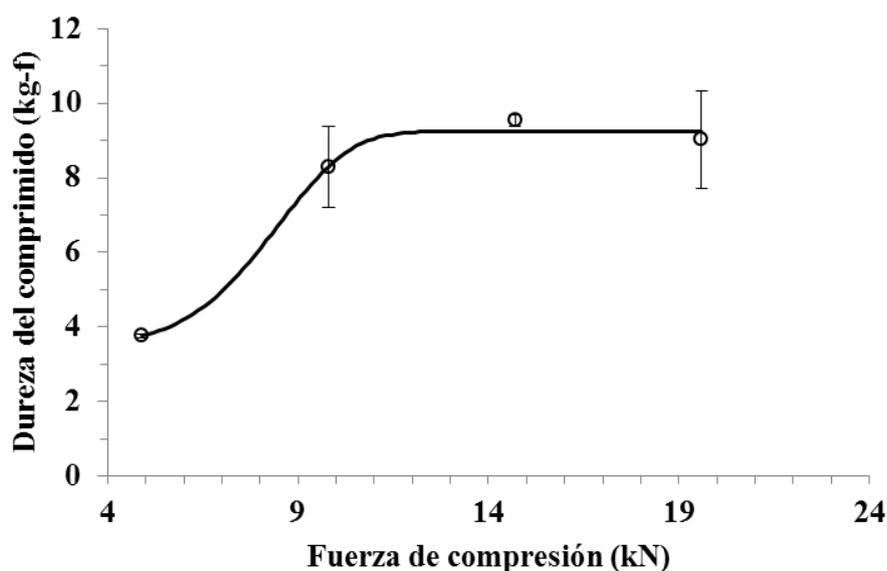


Figura 5.6. Curva de compactibilidad de los polvos con extracto de yerba mate obtenidos por co-cristalización en matrices de sacarosa. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que la línea representa el ajuste del modelo de Weibull (Ec. 3.1)

Los polvos CY10 mostraron un comportamiento de deformación plástica, siendo la dureza del comprimido independiente de la fuerza de compresión a valores mayores que 9.8 kN. Como se observa en la Fig. 5.6, el modelo de Weibull presentó un ajuste satisfactorio a los datos experimentales mostrando valores de  $R^2_{adj} > 0.98$ .

## 2.2. Contenido de humedad y fluidez de las formulaciones de los comprimidos

Se obtuvieron contenidos de humedad de 0.6, 1.8, 1.2 y 1.7% para las formulaciones TY1, TY2, TY3 y TY4, respectivamente, los cuales son favorables para su manipuleo.

Las formulaciones TY1 mostraron mejor fluidez que las mezclas añadidas de almidón de maíz (TY2, TY3 y TY4). Este comportamiento fue atribuido a la alta cohesividad de este excipiente (Jivraj y col., 2000). Además las mezclas TY1 mostraron ángulos de reposo de alrededor de 43°, índices de Hausner (IH) entre 1.0-1.2 e índices de Carr (IC) entre 3-5%. Mientras que las TY2, TY3 y TY4 mostraron ángulos de reposo mayores que 50°, IH entre 1.2-1.5 e IC entre 21-26%, respectivamente. A pesar de los altos valores de ángulo de reposo, los índices de Hausner y Carr sugirieron características de fluidez aceptable para estas mezclas (USP 30-NF 25, 2007).

## 2.3. Efecto de la concentración de almidón sobre la dureza de los comprimidos

En la Fig. 5.7 se muestran los valores de dureza de los comprimidos obtenidos a partir de las distintas formulaciones (TY1, TY2, TY3 y TY4), empleando una fuerza de compresión de 9.8 kN.

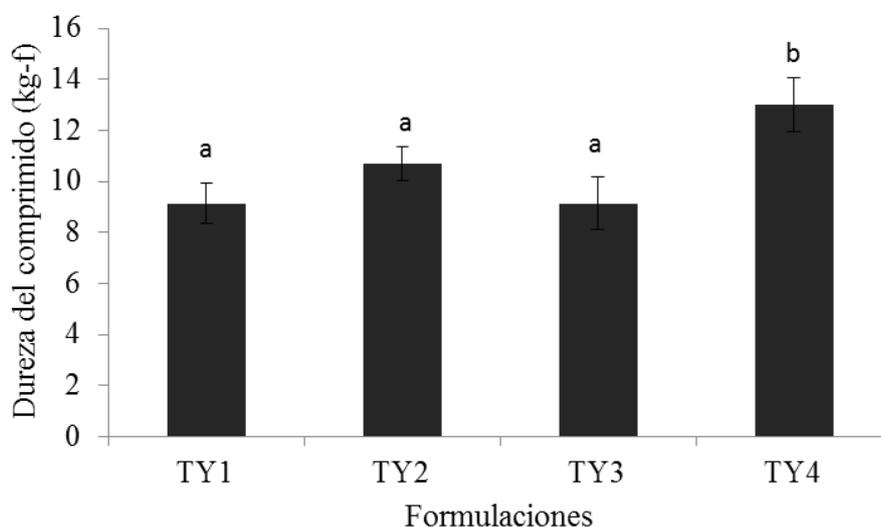


Figura 5.7. Dureza de los comprimidos obtenidos a una fuerza de compresión de 9.8 kN.

Las tabletas obtenidas con las formulaciones TY1, TY2 y TY3 no mostraron diferencias significativas en la dureza ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento evidencia las buenas propiedades de compactibilidad de los polvos con yerba mate obtenidos mediante co-

cristalización en matrices de sacarosa; siendo posible obtener tabletas de similar dureza empleando formulaciones añadidas de almidón como diluyente. Las tabletas con mayor contenido de almidón (TY4), mostraron un aumento significativo en la dureza. Este comportamiento fue atribuido al aumento de la fuerzas cohesivas y de adhesividad en las mezclas por efecto de la presencia del almidón (Jivraj y col., 2000; Nyström y col., 1993). Las formulaciones TY3 fueron seleccionadas para la preparación del sistema compartimentalizado, no sólo porque mostraron adecuados valores de dureza (Lee, 2007), sino también porque su contenido de almidón permitirá una mayor incorporación de zinc a la matriz compuesta.

#### 2.4. Propiedades de las tabletas

En la Tabla 5.4 se muestran las propiedades de los comprimidos control (mezcla 80:20, sacarosa: almidón), con extracto de yerba mate (TY3) y con zinc y extracto de yerba mate (TZY). Las tabletas mostraron espesor, diámetro y peso uniforme.

Tabla 5.4. Propiedades de los comprimidos control (mezcla 80:20, sacarosa: almidón), con extracto de yerba mate (TY3) y con zinc y extracto de yerba mate (TZY).

Parámetro	Control	TY3	TZY
Peso promedio (mg)	476.4 ± 3.9	449.0 ± 17	420.0 ± 8.3
Espesor (mm)	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.3 ± 0.2
Densidad (g cm <sup>-3</sup> )	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.3
Dureza (kg-f)	1.4 ± 0.2	9.1 ± 1.02	12.4 ± 0.6
Tiempo de desintegración <i>in vitro</i> (min)	3.8 ± 0.2	5.8 ± 0.6	5.5 ± 0.4

En general, los comprimidos preparados a partir de polvos obtenidos por co-cristalización (TY3 y TZY) mostraron mayores valores de dureza que los preparados a partir de sacarosa (Control). Por esta razón, ellos requirieron mayores tiempos de desintegración. Además, se obtuvieron valores de dureza más altos para los comprimidos TZY que para los TY3. Este comportamiento fue atribuido a la presencia de zinc. En ensayos complementarios, no se observaron diferencias significativas en los valores de dureza de tabletas preparadas a partir de aglomerados sin compuesto activo mezclados con almidón de maíz nativo o con almidón cargado con zinc.

En la Tabla 5.5 se muestran los contenidos de compuestos activos de las tabletas. Los comprimidos TY3 mostraron mayores concentraciones de compuestos fenólicos que los TZY. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la diferencia en peso de los comprimidos (Tabla 5.4). Ambas, TY3 y TZY, mostraron una buena contribución de polifenoles en comparación con lo consumido diariamente a través de frutas y verduras (alrededor de 5 mg/g sólido seco) (Saura-Calixto y Goñi, 2006). La presencia de ácido cafeico no fue detectada en las tabletas TZY probablemente debido a la baja cantidad de este compuesto en las muestras.

Tabla 5.5. Contenido de compuestos activos de los comprimidos con extracto de yerba mate (TY3) y con zinc y extracto de yerba mate (TZY).

Compuesto activo *	TY3	TZY
Polifenoles totales	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.2
Ácido clorogénico	0.28 ± 0.06	0.16 ± 0.03
Ácido cafeico	0.001 ± 0.0001	nd
Rutina	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.001
Cafeína	0.22 ± 0.06	0.18 ± 0.04
Zinc	0.3 ± 0.1	5.4 ± 0.1

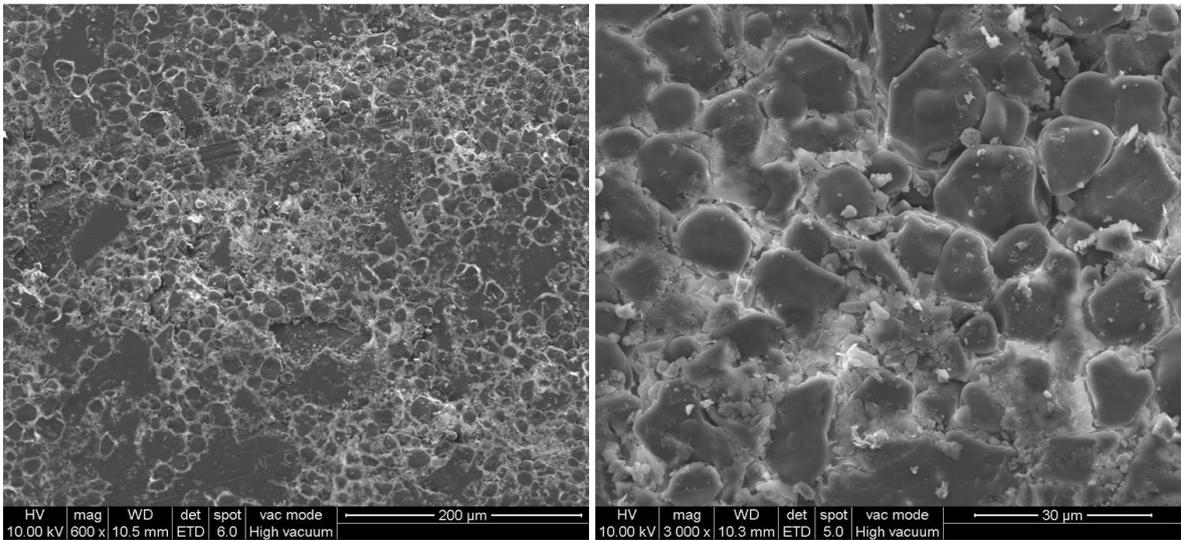
\*mg de compuesto activo/ g de comprimido; nd: no detectado

Los comprimidos compartimentalizados (TZY) mostraron contenidos de Zn (2.3 mg por tableta) correspondientes al 21% de la IDR (WHO y FAO, 2004). En los comprimidos TY3, se detectó una baja concentración de Zn correspondiente al contenido endógeno de este mineral en el extracto de yerba mate (alrededor de 2 mg Zn/L de extracto líquido) (López-Córdoba y col., 2014a).

Como ya se mencionó, actualmente no se ha establecido una ingesta diaria recomendada para los compuestos fenólicos. Sin embargo, en el caso de las tabletas TZY, su consumo se encuentra limitado por los niveles de zinc, a un máximo de 4 tabletas por día.

En la Fig. 5.8 se muestran micrografías SEM de la superficie interior y exterior de las tabletas comprimidas TY3. Se observó una matriz de alta densidad y sin presencia de poros. Además se encontraron gránulos de almidón distribuidos homogéneamente.

## Superficie



## Corte transversal

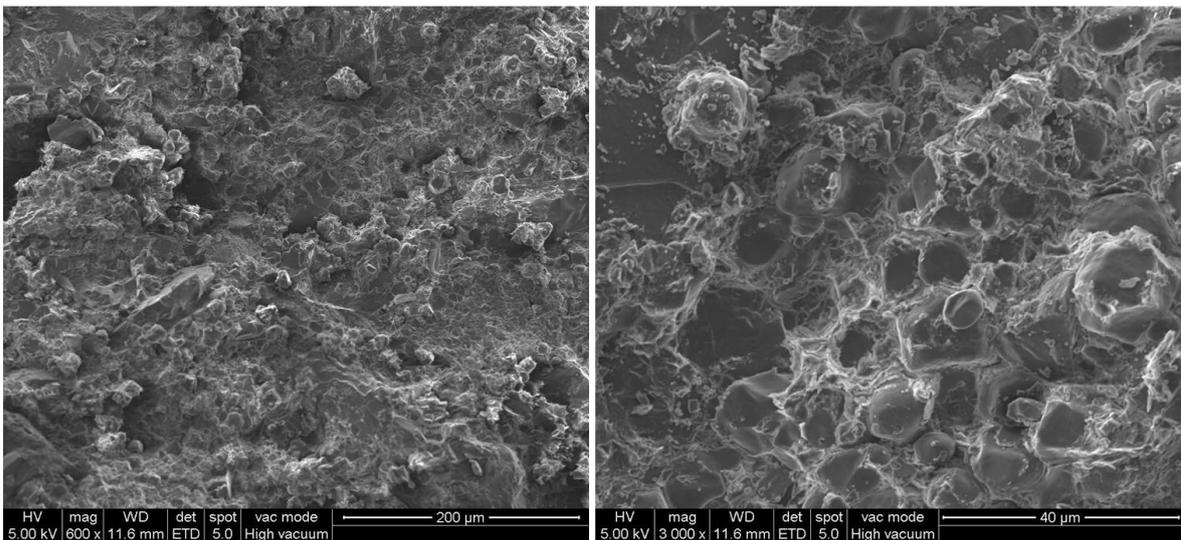


Figura 5.8. Micrografías SEM de los comprimidos obtenidos con las formulaciones TY3.

### 3. Estudios de liberación

Se realizaron estudios de liberación de los comprimidos compartimentalizados con zinc y extracto de yerba mate (TZY). Además, a fines de comparación, se analizó el perfil de liberación de zinc desde los almidones funcionalizados. En la Fig. 5.9 se muestra la cinética de liberación de polifenoles de yerba mate en agua. Los comprimidos mostraron una velocidad de entrega rápida liberando alrededor del 80% de los compuestos a los 5 min de ensayo. El contenido de polifenoles remanente fue liberado a los 20 min de ensayo.

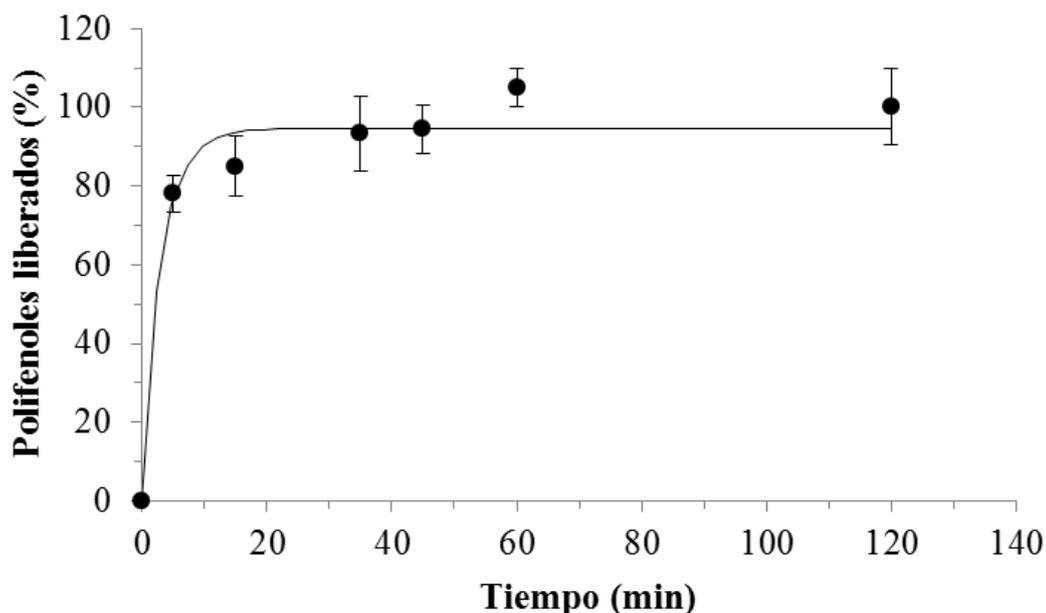


Figura 5.9. Cinética de liberación de polifenoles de yerba mate desde los comprimidos compartimentalizados. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas corresponden a los valores estimados por el modelo cinético de primer orden (Ec. 5.6).

Los perfiles de liberación de zinc desde los vehículos de almidón y las tabletas compartimentalizadas se muestran en la Fig. 5.10. La comparación entre ambos sistemas fue realizada mediante el cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ) (Ec. 5.3). Los almidones funcionalizados y los comprimidos mostraron una velocidad rápida de liberación de zinc en medio acuoso liberando el 50% de la carga de mineral a los 5 min (Fig. 5.10). Se obtuvo un valor de  $f_2$  de 75, indicativo de una alta similitud entre los perfiles de liberación de zinc de ambas matrices. Este comportamiento podría ser atribuido a la desintegración rápida de las tabletas en el agua y la migración de las moléculas de  $ZnSO_4$  débilmente unidas sobre la superficie de los gránulos, como fue observado por SEM-EDX (Fig. 5.3).

En ambos sistemas, la cantidad restante de mineral no fue liberada a lo largo del ensayo. Este comportamiento fue atribuido a la interacción entre el mineral y las unidades constitutivas del almidón como fue observado mediante análisis FTIR. Sin embargo, la liberación total de mineral podría darse en el tracto digestivo por acción de las enzimas pancreáticas (Mundargi y col., 2008; Vilivalam y col., 2000).

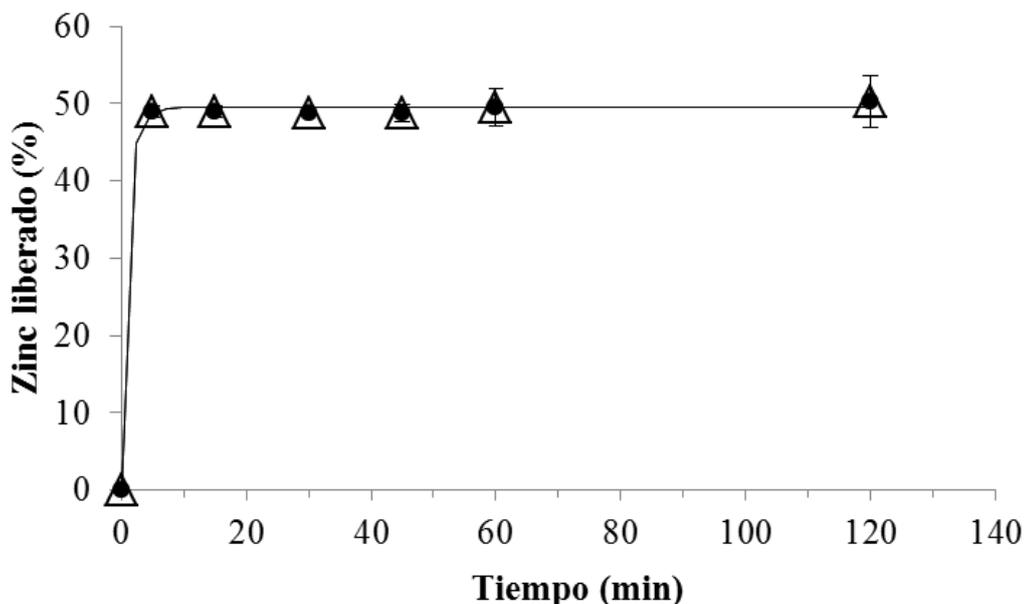


Figura 5.10. Cinética de liberación de zinc desde los vehículos de almidón ( $\Delta$ ) y los comprimidos compartimentalizados ( $\bullet$ ). Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas corresponden a los valores predichos por el modelo cinético de primer orden (Ec. 5.6).

Los modelos matemáticos empíricos de ley de la potencia y difusión-relajación no pudieron ser ajustados a los datos experimentales, debido a que estas ecuaciones son sólo válidas para porcentajes de liberación inferiores al 60% (Peppas y Sahlin, 1989; Ritger y Peppas, 1987). El modelo cinético de primer orden mostró el mejor ajuste a los datos experimentales ( $R^2_{\text{adj}} = 0.99$ ). De acuerdo a Costa y Sousa Lobo (2001), en las matrices que se ajustan a esta ecuación cinética, la liberación del compuesto activo ocurre en forma proporcional a la cantidad remanente en su interior; es por esto que la cantidad liberada en el tiempo va disminuyendo.

#### 4. Evaluación sensorial de las tabletas

En la Fig. 5.11 se muestran los puntajes para cada atributo obtenidos para las tabletas comprimidas con extracto de yerba mate. Para mayor claridad de los resultados, la escala hedónica fue agrupada en tres intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

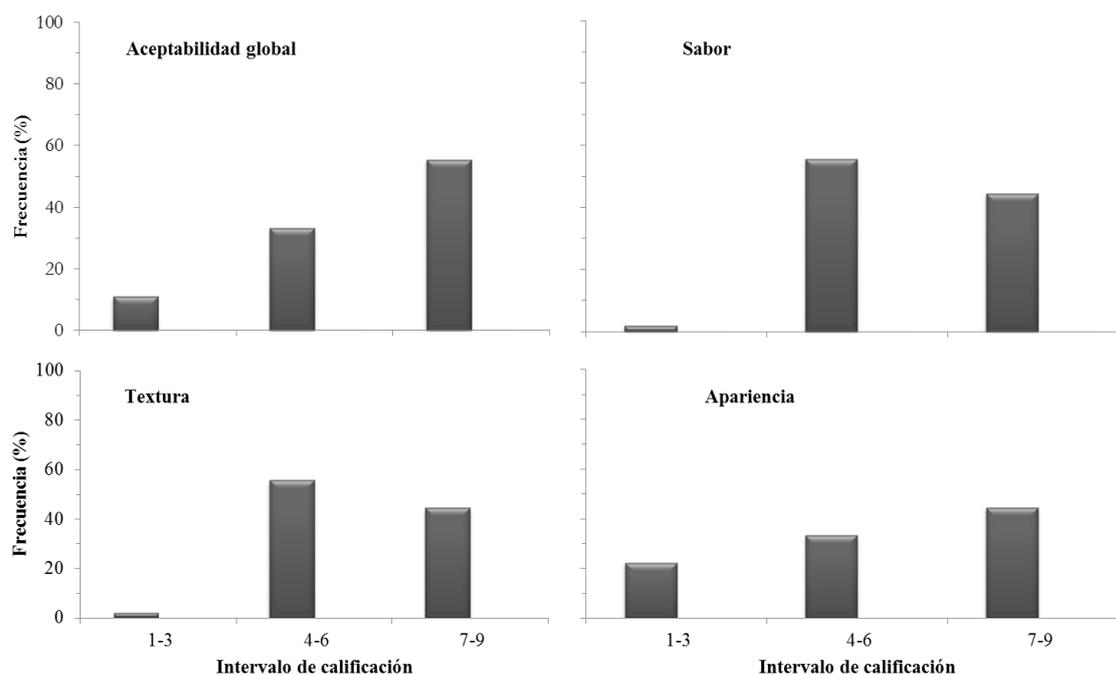


Figura 5.11. Atributos sensoriales de las tabletas comprimidas con extracto de yerba mate. Intervalos de calificación: 1-3 (me disgusta), 4-6 (me es indiferente) y 7-9 (me gusta mucho).

Las tabletas con extracto de yerba mate mostraron un nivel de aceptación global promedio de 6 puntos, esto es “me es indiferente”. Sin embargo, el 56% de los jueces dio puntuaciones de aceptabilidad global a la muestra entre 7-9 puntos. Con respecto al sabor y a la textura, ninguno de los jueces califico las tabletas con valores menores a 4 puntos. Solo el 22% de los evaluadores puntuaron negativamente la apariencia de las tabletas, añadiendo en las observaciones que no es común el consumo de este tipo de productos. La evaluación sensorial de los comprimidos compartimentalizados no fue realizada en este trabajo de tesis debido a que no se realizaron ensayos que permitan garantizar la inocuidad de los nuevos sistemas.

## **Conclusiones parciales**

1. El almidón de maíz nativo resultó ser un vehículo efectivo de zinc, permitiendo la adsorción de altas dosis de este mineral sobre la superficie de los gránulos.
2. Las mezclas de almidón cargado con zinc y polvos con extracto de yerba mate obtenidos mediante co-cristalización con sacarosa permitieron la obtención de tabletas comprimidas con buenas propiedades para la administración simultánea de estos compuestos activos con beneficios para la salud.
3. La estrategia de compartimentalización desarrollada constituye una alternativa para la co-vehiculización de compuestos activos con actividad complementaria.

## Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES

### 1. Extractos antioxidantes de yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

Se obtuvieron extractos de yerba mate con un alto contenido de polifenoles totales, siendo la contribución de los ácidos clorogénicos la más importante. Estos compuestos presentaron una elevada actividad antioxidante inhibiendo el radical libre DPPH y también reduciendo iones férricos, a bajas concentraciones. Los extractos secos mostraron una temperatura de transición vítrea superior a la temperatura ambiente. Sin embargo, estos materiales mostraron una alta higroscopicidad a humedades relativas por encima del 75%.

### 2. Polvos antioxidantes obtenidos por co-cristalización de extracto de yerba mate en matrices de sacarosa y glucosa-sacarosa

Se obtuvieron productos con alto contenido de polifenoles de yerba mate y una alta eficiencia de encapsulación. El empleo del extracto líquido como solvente de la solución precursora mostró una buena distribución del compuesto activo en la matriz. Al comparar la actividad antioxidante del extracto co-cristalizado con la del extracto libre (sin encapsular) se obtuvieron valores similares, indicando que esta propiedad no fue afectada por el proceso ni por los materiales encapsulantes.

La co-cristalización de extractos antioxidantes de yerba mate en matrices de sacarosa resultó ser una estrategia útil para obtener polvos con excelentes propiedades tecnológicas (color y apariencia aceptable, alta solubilidad, buena fluidez y baja higroscopicidad) y valores bajos de contenido de humedad y actividad acuosa. Estas características favorecen el empleo de los polvos antioxidantes de yerba mate a nivel industrial, promoviendo el desuso de aditivos sintéticos.

A lo largo del almacenamiento el contenido de polifenoles totales en los polvos se mantuvo constante, a pesar de la exposición directa de los materiales al ambiente (75% HR y 20°C). Con respecto a la actividad antioxidante, se observaron fluctuaciones en la capacidad inhibitoria de los polvos frente al radical DPPH en el tiempo. Mediante HPLC, se observó un incremento en la cantidad de ácido cafeico y una disminución en el contenido de cafeína, rutina y de ácido clorogénico y sus derivados. Los polvos no presentaron cambios significativos en su cristalinidad, ni tampoco apelmazamiento (“caking”) de las partículas al final del almacenamiento.

La incorporación de los polvos con antioxidantes de yerba mate a otros sistemas vehiculos constituye una opción viable para el desarrollo de productos con propiedades saludables, ricos en compuestos fenólicos. En este sentido, se desarrolló una bebida refrescante a base de los polvos con antioxidantes de yerba mate con una alta aceptación sensorial por parte de los consumidores.

### **3. Sistemas de vehiculización de zinc: polvos y tabletas**

Se obtuvieron polvos conteniendo zinc (17 mg/g) con una alta eficiencia de encapsulación (98%). Estos productos mostraron bajos valores de contenido de humedad y actividad acuosa. Además, fueron de fácil manipuleo, buena fluidez y baja higroscopicidad. Los productos mostraron una distribución homogénea de mineral sobre la superficie.

Los polvos con zinc obtenidos por co-cristalización mostraron excelentes propiedades de compactibilidad, permitiendo la formación de comprimidos con buena dureza y bajos tiempos de desintegración *in vitro* e *in vivo*, aplicando fuerzas de compresión bajas. Se evaluaron los atributos sensoriales de las tabletas (sabor, textura y apariencia) obteniendo altos niveles de aceptación. Los sistemas de vehiculización de zinc (polvos y tabletas) constituyen una estrategia eficaz para suplir los requerimientos nutricionales de zinc de la población en riesgo.

### **4. Sistemas de co-vehiculización de zinc y extracto de yerba mate: polvos y tabletas**

Se prepararon polvos mediante co-cristalización simultánea de zinc y extracto de yerba mate en matrices de sacarosa. En estos productos se observó un descenso significativo en el contenido de ambos compuestos activos (zinc y extracto de yerba mate), en comparación con los polvos conteniendo cada compuesto activo por separado. Asimismo, en los productos combinados, se observó una pérdida importante en la actividad inhibidora del extracto frente al radical DPPH. Mediante HPLC, se evaluaron los cambios en el perfil cuali-cuantitativo de los compuestos fenólicos y la cafeína por efecto de la co-cristalización simultánea del zinc y el extracto de yerba mate. Se observó una reducción significativa en el contenido de ácido clorogénico, rutina y cafeína; y la desaparición total de ácido cafeico. Los polvos conteniendo ambos compuestos activos mostraron buena fluidez y bajos valores de contenido de humedad y actividad acuosa.

Se desarrollaron comprimidos a partir de mezclas de almidón maíz nativo y polvos con zinc y extracto de yerba mate. Las formulaciones mostraron buenas propiedades de manipuleo y permitieron la formación de tabletas con peso uniforme y valores de dureza óptimos. Los sistemas de vehiculización desarrollados constituyen una estrategia potencial para la dosificación de compuestos activos con beneficios para la salud.

#### **5. Sistemas compartimentalizados para co-vehiculización de zinc y antioxidantes de yerba mate**

Se desarrollaron tabletas para el transporte simultáneo de zinc y extracto antioxidante de yerba mate, utilizando una estrategia de compartimentalización. El almidón de maíz fue empleado como vehículo de zinc; para esto se optimizó previamente la cantidad de almidón a emplear para la preparación de las tabletas, que permitiera la máxima incorporación de mineral y la obtención de tabletas con buenas propiedades.

Las formulaciones conteniendo 80 g/100g de mezcla de polvo con antioxidante de yerba mate y 20 g/100g de mezcla de almidón cargado con zinc resultaron ser las más adecuadas en términos de dureza de las tabletas y contenido de compuestos activos. Además estas mezclas mostraron valores bajos de contenido de humedad y óptima fluidez. Las tabletas se desintegraron rápidamente y mostraron una alta velocidad de liberación de los compuestos activos en agua.

Estas matrices podrían ser empleadas potencialmente como suplementos para aumentar el aporte de antioxidantes y minerales de la dieta. La estrategia de compartimentalización desarrollada podría ser usada para el transporte de otros compuestos activos cuando deben evitarse interacciones entre ellos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ades H., K. E., Ungar Y. & Shimoni E. (2012). Complexation with starch for encapsulation and controlled release of menthone and menthol. . *LWT - Food Science and Technology*, 45, 277-288.

Adiba, B. D., Salem, B., Nabil, S., Abdelhakim, M. (2011). Preliminary characterization of food tablets from date (*Phoenix dactylifera* L.) and spirulina (*Spirulina* sp.) powders. *Powder Technology*, 208(3), 725-730.

Al-Abri, S. S., Beeching, N. J., Nye, F. J. (2005). Traveller's diarrhoea. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(6), 349-360.

Amasheh, M., Andres, S., Amasheh, S., Fromm, M., Schulzke, J.-D. (2009). Barrier Effects of Nutritional Factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1), 267-273.

Anbinder, P. S. (2004). Encapsulación de antioxidantes de yerba mate. (Vol. Tesis de grado de Lic. en ciencia y tecnología de alimentos). Balcarce, Argentina: Universidad Nacional de Mar del Plata.

Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., Martino, M. N. (2011). Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: Interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1, 80-87.

Ando, M., Ito, R., Ozeki, Y., Nakayama, Y., Nabeshima, T. (2007). Evaluation of a novel sugar coating method for moisture protective tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2), 319-328.

Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., Filip, R. (2012). Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 299-304.

AOAC. (1998). Official methods of analysis (16th ed.). Gaithersburg, EE.UU.

Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., Gámbaro, A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Research International*, 42(7), 871-878.

Argyropoulos, D., Alex, R., Kohler, R., Müller, J. (2012). Moisture sorption isotherms and isosteric heat of sorption of leaves and stems of lemon balm (*Melissa officinalis* L.)

established by dynamic vapor sorption. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 324-331.

Arranz Martinez, S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis doctoral. *Facultad de Farmacia*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H. P., Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 787-791.

Astolfi-Filho, Z., Souza, A. C., Reipert, É. C. D., Telis, V. R. N. (2005). Encapsulação de suco de maracujá por co-cristalização com sacarose: cinética de cristalização e propriedades físicas. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25, 795-801.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640.

Awad, A., Chen, A. C. (1993). A new generation of sucrose products made by co-crystallization. *Food Technology*, 47(1), 146-148.

Bahl, R., Bhandari, N., Saksena, M., Strand, T., Kumar, G. T., Bhan, M. K., Sommerfelt, H. (2002). Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. *The Journal of Pediatrics*, 141(5), 677-682.

Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. (2005). *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality*. Springer US.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Beristain, C. I., Mendoza, R. E., Garcia, H. S., Vazquez, A. (1994). Cocrystallization of Jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) Granules. *LWT - Food Science and Technology*, 27(4), 347-349.

Beristain, C. I., Vazquez, A., Garcia, H. S., Vernon-Carter, E. J. (1996). Encapsulation of orange peel oil by co-crystallization. *LWT - Food Science and Technology*, 29(7), 645-647.

Berni Canani, R., Buccigrossi, V., Passariello, A. (2011). Mechanisms of action of zinc in acute diarrhea. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(1), 8-12  
10.1097/MOG.1090b1013e32833fd32848a.

Berté, K. (2011). Tecnologia da erva-Mate solúvel. *Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos* (Vol. PhD thesis). Curitiba, Brazil: Universidade Federal Do Paraná.

Berte, K. A., Beux, M. R., Spada, P. K., Salvador, M., Hoffmann-Ribani, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J Agric Food Chem*, 59(10), 5523-5527.

Bhandari, B. R., Datta, N., D'Arcy, B. R., Rintoul, G. B. (1998). Co-crystallization of honey with sucrose. *Food Science And Technology*, 31(2), 138-142.

Bhandari, B. R., Hartel, R. W. (2002). Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. *Journal of Food Science*, 67(5), 1797-1802.

Bhandari, B. R., Howes, T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40(1-2), 71-79.

Billings, S. W., Bronlund, J. E., Paterson, A. H. J. (2006). Effects of capillary condensation on the caking of bulk sucrose. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 887-895.

Błaszczak, W., Valverde, S., Fornal, J. (2005). Effect of high pressure on the structure of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 377-383.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.

Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A., Nunes, E. (2003). Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med*, 9(3), 379-387.

Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378-384.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.

Brizuela, A. B., Bichara, L. C., Romano, E., Yurquina, A., Locatelli, S., Brandán, S. A. (2012). A complete characterization of the vibrational spectra of sucrose. *Carbohydrate Research*, 361(0), 212-218.

Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 330(3), 1173-1178.

Brown, K. H., Rivera, J. A., Bhutta, Z., Gibson, R. S., King, J. C., Lonnerdal, B., Ruel, M. T., Sandtrom, B., Wasantwisut, E., Hotz, C. (2004). International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*, 25(1 Suppl 2), S99-203.

Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., Teller, E. (1940). On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62(7), 1723-1732.

Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(0), 15-25.

Castillo, S., Villafuerte, L. (1995). Compactibility of ternary mixtures of pharmaceutical powders. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70(4), 329-337.

Ciesielski, W., Lii, C.-y., Yen, M.-T., Tomasik, P. (2003). Interactions of starch with salts of metals from the transition groups. *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 47-56.

Ciesielski, W., Tomasik, P. (2003). Thermal properties of complexes of amaranthus starch with selected metal salts. *Thermochimica Acta*, 403(2), 161-171.

Ciesielski, W., Tomasik, P. (2004). Werner-type metal complexes of potato starch. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(6), 691-698.

Código Alimentario Argentino.  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp). Último acceso 22/10/2014. Argentina.

Comunian, T. A., Monterrey-Quintero, E. S., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., Piccone, P., Pittia, P., Favaro-Trindade, C. S. (2011). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum Arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(6), 1259-1265.

Costa, P., Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133.

Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.

Chan, E.-S., Wong, S.-L., Lee, P.-P., Lee, J.-S., Ti, T. B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S.-H., Yim, Z.-H. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225-232.

Chandra, S., Gonzalez de Mejia, E. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3583-3589.

Chen, A. C., Veiga, M. F., Rizzuto, A. B. (1988). Cocrystallization: an encapsulation process. *Food Technology*, 42(11), 87-90.

Chen, P., Yu, L., Simon, G. P., Liu, X., Dean, K., Chen, L. (2011). Internal structures and phase-transitions of starch granules during gelatinization. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1975-1983.

Cho, Y. H., Park, J. (2002). Characteristics of Double-Encapsulated Flavor Powder Prepared by Secondary Fat Coating Process. *Journal of Food Science*, 67(3), 968-972.

Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 388-395.

De Campos, R. M. L., Hierro, E., Ordóñez, J. A., Bertol, T. M., Terra, N. N., de la Hoz, L. (2007). Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. *Food Chemistry*, 103(4), 1159-1167.

De Moraes, E. C., Stefanuto, A., Klein, G. A., Boaventura, B. C. B., de Andrade, F., Wazlawik, E., Di Pietro, P. c. F., Maraschin, M., da Silva, E. L. (2009). Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8316-8324.

De Sotillo, D. R., Hadley, M., Holm, E. T. (1994). Phenolics in Aqueous Potato Peel Extract: Extraction, Identification and Degradation. *Journal of Food Science*, 59(3), 649-651.

De Souza, R., De Giovani, W. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97-104.

De Souza, R., De Giovani, W. (2005). Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(9), 1985-1990.

Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.

Deladino, L. (2010). Encapsulación de antioxidantes de yerba mate para su incorporación en alimentos funcionales. *Facultad de Ciencias Exactas* (Vol. PhD thesis). La Plata, Buenos Aires: Universidad Nacional de la Plata.

Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2007a). Cocrystallization of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) and mineral salts within a sucrose matrix. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 573-580.

Deladino, L., Navarro, A., Martino, M. N. (2007b). Encapsulation of active compounds: Ionic gelation and cocrystallization as case studies. In C. E. Lupano (Ed.). *Functional Properties of Food Components* (pp. 125-157).

Deladino, L., Schneider Teixeira, A., Reta, M., Molina García, A. D., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2013). Major phenolics in yerba mate extracts (*Ilex paraguariensis*) and their contribution to the total antioxidant capacity. *Food and Nutrition Sciences*, 4(8A), 154-162.

Deladino, L., Teixeira, A. S., Navarro, A. S., Alvarez, I., Molina-García, A. D., Martino, M. (2014). Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants. *Food and Bioproducts Processing*(0).

Dennehy, P. H. (2005). Acute diarrheal disease in children: epidemiology, prevention, and treatment. *Infectious disease clinics of North America*, 19(3), 585-602.

Desai, K. G. H., Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.

Dorset, D. L. (1998). X-ray Diffraction: A Practical Approach. *Microscopy and Microanalysis*, 4(05), 513-515.

dos Santos, C., Buera, M. P., Mazzobre, M. F. (2012). Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of  $\beta$ -cyclodextrins complexes. *Food Chemistry*, 132(4), 2030-2036.

Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Jacques, R. A., Caramao, E. B., Mondello, L. (2009). High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7213-7221.

Fang, Z., Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139-1147.

Fennema, O. R., Tannenbaum, S. R. (1996). Introduction to food chemistry. *Food Science and Technology*. New York:Marcel Dekker Inc., 1-16.

Fernandes, F. A., Santana, C., Santos, R., Correia, L., Conceição, M., Macêdo, R., Medeiros, A. (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113(2), 443-447.

Fernández, P. P., Sanz, P. D., Martino, M. N., Molina-García, A. D. (2008). Partially-gelatinised starches by high hydrostatic pressure as oligoelement carriers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 129-137.

Fu, B., Labuza, T. P. (1993). Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4(3), 125-133.

Fuchs, G. J. (1998). Possibilities for zinc in the treatment of acute diarrhea. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2), 480S-483S.

Gallo, L., Piña, J., Bucalá, V., Allemandi, D., Ramírez-Rigo, M. V. (2013). Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on co-spray-dried powders. *Powder Technology*, 241(0), 252-262.

Geary, P. (2008). The co-crystallisation of sugars by the supersaturation process. (Vol. PhD thesis). UK: University of Hull.

Gibson, R. S., Ferguson, E. L. (1998). Nutrition intervention strategies to combat zinc deficiency in developing countries. *Nutrition Research Reviews*, 11(01), 115-131.

Gopi, D., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., Kavitha, L. (2013). Synthesis and spectroscopic investigations of hydroxyapatite using a green chelating agent as template. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 104(0), 292-299.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.

Gugliucci, A. (1996). Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(2), 338-344.

Guiotto, E., Ixtaina, V., Nolasco, S., Tomás, M. (2014). Effect of Storage Conditions and Antioxidants on the Oxidative Stability of Sunflower–Chia Oil Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(5), 767-776.

Halliwell, B. (2001). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.

Hartel, R. W., Ergun, R., Vogel, S. (2011). Phase/State Transitions of Confectionery Sweeteners: Thermodynamic and Kinetic Aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 17-32.

Hartel, R. W., Shastry, A. V. (1991). Sugar crystallization in food products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 30(1), 49-112.

Hartmann, M., Palzer, S. (2011). Caking of amorphous powders — Material aspects, modelling and applications. *Powder Technology*, 206(1–2), 112-121.

Heck, C. I., González de Mejía, E. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), R138-R151.

Heck, C. I., Schmalko, M., González de Mejía, E. (2008). Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8394-8403.

Hemmerle, H., Burger, H.-J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P. W., Paulus, E., Herling, A. W. (1997). Chlorogenic Acid and Synthetic Chlorogenic Acid Derivatives: Novel Inhibitors of Hepatic Glucose-6-phosphate Translocase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(2), 137-145.

Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., et al. (2004). The su.vi.max study: A randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of Internal Medicine*, 164(21), 2335-2342.

Hercberg, S., Preziosi, P., Briançon, S., Galan, P., Triol, I., Malvy, D., Roussel, A.-M., Favier, A. (1998). A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: The SU.VI.MAX study—design, methods, and participant characteristics. *Controlled Clinical Trials*, 19(4), 336-351.

Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81(2), 410-417.

Hersh, T. (1999). A mixture of reduced glutathione, selenium or a selenium compound for reducing free radical damage induced by tobacco products and environmental pollutants. United States Patent, US5922346 A.

Hill, S. W., Varker, A. S., Karlage, K., Myrdal, P. B. (2009). Analysis of drug content and weight uniformity for half-tablets of 6 commonly split medications. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*, 15(3), 253-261.

Hobbs, D. A., Ashouri, A., George, T. W., Lovegrove, J. A., Methven, L. (2014). The consumer acceptance of novel vegetable-enriched bread products as a potential vehicle to increase vegetable consumption. *Food Research International*, 58(0), 15-22.

Hosseini, A., Körber, M., Bodmeier, R. (2013). Direct compression of cushion-layered ethyl cellulose-coated extended release pellets into rapidly disintegrating tablets without changes in the release profile. *International Journal of Pharmaceutics*, 457(2), 503-509.

Hough, G., Wakeling, I., Mucci, A., Chambers Iv, E., Gallardo, I. M., Alves, L. R. (2006). Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. *Food Quality and Preference*, 17(6), 522-526.

Huber, K. C., BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 269-276.

Iglesias, H. A., Chirife, J. (1995). An alternative to the Guggenheim, Anderson and De Boer model for the mathematical description of moisture sorption isotherms of foods. *Food Research International*, 28(3), 317-321.

Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122(3), 695-699.

Ivanova, E., Teunou, E., Poncelet, D. (2005). Encapsulation of water sensitive products: effectiveness and assessment of fluid bed dry coating. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 223-230.

Jacobs, D. R., Jr., Gross, M. D., Tapsell, L. C. (2009). Food synergy: an operational concept for understanding nutrition. *Am J Clin Nutr*, 89(5), 11.

Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, F., Kuhnert, N. (2010). Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5471-5484.

Janaswamy, S. (2014). Encapsulation altered starch digestion: Toward developing starch-based delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 101(0), 600-605.

Jaya, S., Das, H. (2004). Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. *Journal of Food Engineering*, 63(2), 125-134.

JCPDS. (1999). Database for standard reference materials from Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) USA.

Jivraj, M., Martini, L. G., Thomson, C. M. (2000). An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(2), 58-63.

Juliano, P., Barbosa-Cánovas, G. V. (2010). Food Powders Flowability Characterization: Theory, Methods, and Applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 211-239.

Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749-1770.

Korsmeyer, R. W., Von Meerwall, E., Peppas, N. A. (1986). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. II. Verification of theoretical models. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 24(2), 409-434.

Kosaraju, S. L., Labbett, D., Emin, M., Konczak, I., Lundin, L. (2008). Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutrition & Dietetics*, 65, S48-S52.

Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 193-201.

Kuo, S.-M., Leavitt, P., Lin, C.-P. (1998). Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. *Biological Trace Element Research*, 62(3), 135-153.

Lee, B. J. (2007). Pharmaceutical Preformulation: Physicochemical Properties of Excipients and Powders and Tablet Characterization. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook* (pp. 879-931): John Wiley & Sons, Inc.

Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., Xin, Z., Cao, L., Hu, Q. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 297-301.

Lii, C.-y., Tomasik, P., Hung, W.-L., Lai, V. M. F. (2002). Revised look at the interaction of starch with electrolyte: effect of salts of metals from the first non-transition group. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 35-45.

Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 928-935.

López-Córdoba, A. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate, Master Thesis. *Facultad de Ciencias Exactas*. La Plata, Buenos Aires: Universidad Nacional de la Plata.

López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 315-323.

López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2014a). Corn starch-calcium alginate matrices for the simultaneous carrying of zinc and yerba mate antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 641-648.

López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2014b). Corn starch-calcium alginate matrices for the simultaneous carrying of zinc and yerba mate antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.021>.

López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2014c). Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydrate Polymers*, 99(0), 150-157.

Luo, Z., Cheng, W., Chen, H., Fu, X., Peng, X., Luo, F., Nie, L. (2013a). Preparation and Properties of Enzyme-Modified Cassava Starch–Zinc Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4631–4638.

Luo, Z., Cheng, W., Chen, H., Fu, X., Peng, X., Luo, F., Nie, L. (2013b). Preparation and Properties of Enzyme-Modified Cassava Starch–Zinc Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4631-4638.

Makris, D. P., Rossiter, J. T. (2000). Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3830-3838.

Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379-386.

Marques, V., Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113(4), 1370-1376.

Martinet, A., Hostettmann, K., Schutz, Y. (1999). Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. *Phytomedicine*, 6(4), 231-238.

Mathlouthi, M., Rogé, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food Chemistry*, 82(1), 61-71.

Maulny, A. P. E., Beckett, S. T., Mackenzie, G. (2005). Physical properties of co-crystalline sugar and honey. *Journal of Food Science*, 70(9), E567-E572.

McBride, R. L., Johnson, R. L. (1987). Perception of sugar-acid mixtures in lemon juice drink. *International Journal of Food Science & Technology*, 22(4), 399-408.

Milner, J. A. (1990). Trace minerals in the nutrition of children. *The Journal of Pediatrics*, 117(2, Part 2), S147-S155.

Moon, J.-K., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.

Moț, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., Sârbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 516-522.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.

Mundargi, R. C., Shelke, N. B., Rokhade, A. P., Patil, S. A., Aminabhavi, T. M. (2008). Formulation and in-vitro evaluation of novel starch-based tableted microspheres for controlled release of ampicillin. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 42-53.

Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380-386.

Newman, A. W., Reutzel-Edens, S. M., Zografi, G. (2008). Characterization of the “hygroscopic” properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(3), 1047-1059.

Nyström, C., Alderborn, G., Duberg, M., Karehill, P.-G. (1993). Bonding Surface area and Bonding Mechanism—Two Important Factors for the Understanding of Powder Comparability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19(17-18), 2143-2196.

Onwulata, C. I. (2011). Encapsulation of new active ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 183-202.

Papadopoulou, A., Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3–4), 186-190.

Parada, J., Aguilera, J. M. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-R32.

Penner, E., Schmidt, S. (2013). Comparison between moisture sorption isotherms obtained using the new Vapor Sorption Analyzer and those obtained using the standard saturated salt slurry method. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7(4), 185-193.

Peppas, N. A., Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), 169-172.

Pérez-Alonso, C., Beristain, C. I., Lobato-Calleros, C., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J. (2006). Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 753-760.

Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Martinez, S., Belščak, A. (2009). Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 113(2), 394-400.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., Nicoli, M. C. (2004). Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1177-1180.

Pizarro, F., Calvo, E. (2009). El significado a mediano y largo plazo de la deficiencia de hierro y zinc durante los primeros dos años de vida, para asegurar un buen crecimiento temprano. *Instituto Danone del Cono Sur*. <http://www.bvsde.paho.org/texcom/cd050833/pizarro.pdf>.

Pokorný, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 2(0), 223-227.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food - Practical Applications. Woodhead Publishing.

Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*, 130(5S Suppl), 1447S-1454S.

Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F. W. J., Kucuk, O., Sarkar, F. H. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(8), 1182-1190.

Rassis, D. K., Saguy, I. S., Nussinovitch, A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocolloids*, 16(2), 139-151.

Raymond, C. R., Paul, J. S., Sian, C. O. (2006). Handbook of pharmaceutical excipients. *American Pharmaceutical Association, Washington DC*.

Ritger, P. L., Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37-42.

Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., Santos, J. (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*, 134(1), 1-8.

Roehr, M., Kubicek, C. P., Komínek, J. (2008). Citric Acid. *Biotechnology Set* (pp. 307-345): Wiley-VCH Verlag GmbH.

Rømer Rassing, M. (1994). Chewing gum as a drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13(1-2), 89-121.

Saha, J., Podder, J. (2011). Crystallization Of Zinc Sulphate Single Crystals And Its Structural, Thermal And Optical Characterization. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences* 35(2), 203-210.

Salameh, A. K., Mauer, L. J., Taylor, L. S. (2006). Deliquescence Lowering in Food Ingredient Mixtures. *Journal of Food Science*, 71(1), E10-E16.

Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. (2000). Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research*, 20(5), 737-755.

Sandstead, H. H. (2000). Causes of Iron and Zinc Deficiencies and Their Effects on Brain. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 347.

Sardar, B. R., Singhal, R. S. (2013). Characterization of co-crystallized sucrose entrapped with cardamom oleoresin. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 521-529.

Saura-Calixto, F. (2010). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49.

Saura-Calixto, F., Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442-447.

Schmidt, S. J., Lee, J. W. (2011). Comparison Between Water Vapor Sorption Isotherms Obtained Using The New Dynamic Dewpoint Isotherm Method and those Obtained Using The Standard Saturated Salt Slurry Method. *International Journal of Food Properties*, 15(2), 236-248.

Schultheiss, N., Newman, A. (2009). Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Crystal Growth & Design*, 9(6), 2950-2967.

Shrimpton, R., Gross, R., Darnton-Hill, I., Young, M. (2005). Zinc deficiency: what are the most appropriate interventions? *Bmj*, 330(7487), 347-349.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In P. Lester (Ed.). *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 299, pp. 152-178): Academic Press.

Sinija, V. R., Mishra, H. N. (2008). Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant (soluble) green tea powder and green tea granules. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 494-500.

Smigielska, H., Lewandowicz, G., Goslar, J., Hoffmann, S. K. (2005). Binding of the trace elements: Cu(II) and Fe(III) to the native and modified nutritive potato starches studied by electron paramagnetic resonance. *Acta Phisica Pol*, 108(2), 303-331.

Solomons, N. W., Romero-Abal, M.-E., Weiss, G., Michalke, B., Schumann, K. (2011). Bioavailability of zinc from NutriSet zinc tablets compared with aqueous zinc sulfate. *Eur J Clin Nutr*, 65(1), 125-131.

Sonnergaard, J. M. (2006). Quantification of the compactibility of pharmaceutical powders. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(3), 270-277.

Staroszczyk, H., Janas, P. (2010). Microwave-assisted synthesis of zinc derivatives of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 962-969.

Stein, F. L. P., Schmidt, B., Furlong, E. B., Soares, L. A. S., Soares, M. C. F., Vaz, M. R. C., Baisch, A. L. M. (2005). Vascular Responses to Extractable Fractions of *Ilex paraguariensis* in Rats Fed Standard and High-Cholesterol Diets. *Biological Research For Nursing*, 7(2), 146-156.

Sugimoto, M., Narisawa, S., Matsubara, K., Yoshino, H., Nakano, M., Handa, T. (2006). Development of manufacturing method for rapidly disintegrating oral tablets using the crystalline transition of amorphous sucrose. *International Journal of Pharmaceutics*, 320(1-2), 71-78.

Tapiero, H., Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.

Tomasik, P., Anderegg, J. W., Baczkowicz, M., Jane, J. L. (2001). Potato starch derivatives with some chemically bound bioelements. *Acta Pol Pharm*, 58(6), 447-452.

Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(10), 1950-1958.

USP 30-NF 25. (2007). United States Pharmacopeia -National Formulary. Rockville, MD.

Valerga, J., Shorthose, R., Lanari, M. C. (2013). Antioxidant activity of yerba mate extracts: Interactions between the individual polyphenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(5), 513-525.

van Campen, L., Amidon, G. L., Zografi, G. (1983). Moisture sorption kinetics for water-soluble substances I: Theoretical considerations of heat transport control. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(12), 1381-1388.

Vega-Gálvez, A., Lemus-Mondaca, R., Fito, P., Andrés, A. (2007). Note: Moisture Sorption Isotherms and Isothermic Heat of Red Bell Pepper (var. Lamuyo). *Food Science and Technology International*, 13(4), 309-316.

Vilivalam, V. D., Illum, L., Iqbal, K. (2000). Starch capsules: an alternative system for oral drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(2), 64-69.

Viña, S. Z., Chaves, A. R. (2006). Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 94(1), 68-74.

Walker, C. L. F., Fontaine, O., Young, M. W., Black, R. E. (2009). Zinc and low osmolarity oral rehydration salts for diarrhoea: a renewed call to action. *Bulletin of the World Health Organization*, 87, 780-786.

Wanasundara, P. K. J. P. D., Shahidi, F. (2005). Antioxidants: science, technology, and applications. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*: John Wiley & Sons, Inc.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S. E. (2010). Materials for Encapsulation Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. In N. J. Zuidam, V. Nedovic (Eds.) (pp. 31-100): Springer New York.

Wang, H., Zhao, Y., Wu, Y., Hu, Y.-l., Nan, K., Nie, G., Chen, H. (2011). Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 32(32), 8281-8290.

Wang, X., Du, Y., Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21-26.

WHO. (2002). The world health report: reducing risks, promoting healthy life. [http://www.who.int/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf).

WHO. (2005). Preventing chronic diseases: a vital investment. [http://www.who.int/chp/chronic\\_disease\\_report/en/](http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en/) accessed November 8, 2014.

WHO. (2006). Oral rehydration salts: Production of the new ORS. *Geneva, Switzerland*.

WHO. (2007). Production of Zinc Tablets and Zinc Oral Solutions: guidelines for programme managers and pharmaceutical manufacturers. *Geneva, Switzerland*. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43589> accessed June 13, 2014.

WHO, FAO. (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition. <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/>.

WHO, UNICEF. (2004). Joint statement on the clinical management of acute diarrhea. [http://www.unicef.org/publications/files/ENAcute\\_Diarrhoea\\_reprint.pdf](http://www.unicef.org/publications/files/ENAcute_Diarrhoea_reprint.pdf).

Xiang, Z., Ning, Z. (2008). Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1189-1203.

Yao, W., Yu, X., Lee, J. W., Yuan, X., Schmidt, S. J. (2011). Measuring the Deliquescence Point of Crystalline Sucrose as a Function of Temperature Using a New Automatic Isotherm Generator. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 882-893.

Yatsu, F. K., Borghetti, G. S., Bassani, V. L. (2011). Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Mate) spray-dried powder. *J Med Food*, 14(4), 413-419.

Zago, M. P., Oteiza, P. I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(2), 266-274.

Zea, L. P., Yusof, Y. A., Aziz, M. G., Ling, C. N., Amin, N. A. M. (2013). Compressibility and dissolution characteristics of mixed fruit tablets made from guava and pitaya fruit powders. *Powder Technology*, 247(0), 112-119.

Zhang, L., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Gu, F. X., Basto, P. A., Bagalkot, V., Jon, S., Langer, R. S., Farokhzad, O. C. (2007). Co-Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs from Nanoparticle–Aptamer Bioconjugates. *ChemMedChem*, 2(9), 1268-1271.

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263-271.

Zhao, J., Madson, M. A., Whistler, R. L. (1996). Cavities in porous corn starch provide a large storage space. *Cereal Chemistry*, 73(3), 379-380.

Zobel, H. F. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch - Stärke*, 40(1), 1-7.